

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

KATEDRA BIOFYZIKY



DIPLOMOVÁ PRÁCA

Teplom stimulovaná zmena termostability thylakoidných membrán a
plazmalemy

Vypracoval: Martin Šimo

Študijný obor: Biofyzika

Vedúci diplomovej práce: Doc. RNDr. Petr Ilík, Ph.D.

Ďakujem vedúcemu diplomovej práce Doc. RNDr. Petrovi Ilíkovi, Ph.D., za vedenie a odbornú pomoc. Ďalej ďakujem Mgr. Jiřímu Frolcovi, Ph.D. za konzultácie a RNDr. Pavlu Krchňákovi, Ph.D. za zostavenie aparatury.

Prehlasujem, že diplomovú prácu na danú tému som vypracoval samostatne pod vedením Doc. RNDr. Petra Ilíka, Ph.D., a s použitím literatúry uvedenej v závere práce.

V Olomouci dňa

Súhrn

Predkladaná diplomová práca je zameraná na problematiku teplom stimulovanej zmeny termostability thylakoidnej membrány a plazmalemy. V práci bola vypracovaná rešerš problematiky. V praktickej časti diplomovej práce boli uskutočnené merania pre kontrolné vzorky, vzorky infiltrované DCMU alebo bromoxynilom, vzorky predhriate na 35°C a vzorky pripravené kombináciami predhrievania a infiltrácie inhibítorom. Termostabilita plazmalemy bola skúmaná pomocou krivky mernej vodivosti média v závislosti na teplote a termostabilita thylakoidnej membrány pomocou fluorescenčnej teplotnej krivky, ktoré boli zaznamenané súbežne počas lineárneho ohrevu vzoriek z 25°C na 65°C pri rýchlosti lineárneho ohrevu 1°C.min⁻¹. Kritické teploty pre všetky metódy boli porovnané navzájom a diskutované vzhľadom k výsledkom iných autorov.

Namerané výsledky prezentované v predkladanej práci vedú k záveru, že významným faktorom ovplyvňujúcim termostabilitu thylakoidnej membrány môže byť xantofylový cyklus. Je známe, že pri zvýšenom ožiarení vzoriek dochádza k premenou violaxantínu na zeaxantín. Vzorky vystavené vyšším intenzitám ožiarenia pri meraní vykazovali zvýšenie termostability thylakoidnej membrány až o 2,4°C. Aj keď v práci nebola koncentrácia xantofylov stanovovaná, molekula zeaxantínu môže okrem svojej ochrannej funkcie proti reaktívnym formám kyslíka v xantofylovom cykle zároveň aj významne ovplyvňovať termostabilitu thylakoidnej membrány. Táto teória by bola v súlade s publikovanou literatúrou (najmä práce Havaux a kol.)

Zároveň nebol preukázaný efekt predhrievania po dobu 90 minút (inkubácia vzoriek pri zvýšenej teplote 35°C tesne pred meraním) na adaptáciu rastliny a zvýšenie termostability membrán. Podľa prác iných autorov má predhrievanie viesť k zvýšenej termostabilite plazmalemy. V diplomovej práci tento efekt nebol potvrdený. Ako sa

ukázalo v závere meraní, 90-minútová doba predhrievania nie je dostatočná pre adaptáciu rastlín na zvýšené teploty a nedochádza tak z zvýšeniu termostability. Oproti tomu pestovanie rastlín pri zvýšenej teplote po dobu 3 dní pred meraním viedlo k preukázateľnému zvýšeniu termostability adaptovaných rastlín.

Summary

Presented diploma project is focused on heat-stimulated changes of thylakoid and cell membrane thermostability. The measurement of fluorescence temperature curve was used for investigation of thylakoid membrane thermostability and the measurement of conductivity temperature curve was used for investigation of cell membrany thermostability. Both methods were performed simultaneously during linear heating of samples from 25°C to 65°C at a linear heating rate of 1 °C.min⁻¹.

The measurements were performed with the control samples, samples infiltrated by DCMU or bromoxynil, samples preheated to 35°C and samples prepared by both treatments simultaneously. The critical temperatures for both methods were compared to each other and discussed with regard to the results of other authors.

Xantophyl cycle was shown as an important factor influencing thylakoid membrane thermostability. The conversion of violaxanthin to zeaxanthin is driven by increased irradiance of the samples. Irradiated samples showed increased thylakoid membrane thermostability by up to 2.4°C. Thus the molecule of zeaxanthin molecule might therefore has not only a protective function against reactive forms of oxygen, but may also significantly affect thylakoid membrane thermostability.

It also has been demonstrated that pre-heating of the samples (incubation of samples at elevated temperature of 35°C for 90 minutes before the measurement) does not show excepted effect. According to the results of other authors preheating should lead to increased cell membrane thermostability. In this diploma project this effect was not confirmed. As it showed in the end of project, pre-heating of samples for 90 minutes is not enough for adaptation. Long-term adaptation of plants by growing in elevated temperature of 35°C for last 3 days before the measurement has desired and

expected effect. The conclusion is that time of 90 minutes is too short and longer adaptation process is needed for plants to adapt and resist to temperatures elevated over 35°C. On the other side plant growth in elevated temperature (35°C) for longer period (3 days before measurement) led to significant adaptation and increase of thermostability.

Zoznam použitých skratiek

chl a, b – chlorofyl a, b

CTC – *ang.* conductivity temperature curve - teplotná krivka mernej vodivosti média

DCMU - 3-(3,4-dichlórfenyl)-1,1-dimetyl močovina

DGDG – digalactosyldiacyl glycerol

FIJ – fluorescenčný indukčný jav

FTC – *ang.* fluorescence temperature curve - fluorescenčná teplotná krivka

LHCII – *ang.* light-harvesting complex - svetlozberný komplex PSII

MGDG – monogalactosyldiacyl glycerol

NBFL – *ang.* non-bilayer forming lipid - lipid, ktorý netvorí membránovú dvojvrstvu

OEC – *ang.* oxygen evolving complex - komplex vyvíjajúci kyslík

PAR – *ang.* Photosynthetic active radiation - fotosynteticky aktívne žiarenie

PPC – pigment - proteínový komplex

PSI, PSII – fotosystém I, fotosystém II

RC – reakčné centrum fotosystému

ROS – *ang.* reactive oxygen species – reaktívna forma kyslíku

Q_A, Q_B – chinónové prenášače PSII

T_k – teplota, pri ktorej má CTC krivka maximálnu krivosť = kritická teplota
termostability plazmalemy

T_{c(M1)} resp. T_{c(M2)} – kritická teplota fluorescenčnej teplotnej krivky pred nárastom
intenzity fluorescencie do 1. resp. 2. maxima

T_{M1} resp. T_{M2} – teplota, pri ktorej FTC krivka dosahuje prvé resp. druhé maximum

Obsah

1. Úvod.....	10
2. Prehľad problematiky	12
2.1 Zloženie, štruktúra a termostabilita plazmalemy	12
2.2 Praktické stanovenie termostability membrán	13
2.3 Zloženie, štruktúra a termostabilita thylakoidnej membrány	18
2.3.1 Fázové prechody lipidov	18
2.3.2 Xantofylový cyklus a jeho ochranné funkcie	23
3. Cieľ práce.....	25
4. Materiál a metódy	26
4.1 Rastlinný materiál	26
4.2 Príprava vzoriek	26
4.2 Popis aparatury	28
4.3 Meranie mernej vodivosti média	30
4.4 Meranie fluorescenčnej teplotnej krivky FTC	31
4.5 Spracovanie dát	31
5. Výsledky	34
5.1 Výsledky stanovenia termostability thylakoidnej membrány	34
5.2 Výsledky stanovenia termostability plazmalemy	39
5.3 Porovnanie výsledkov pre rôzne metódy prípravy vzoriek v závislosti na intenzite meracieho svetla.....	41
5.4 Porovnanie FTC a CTC kriviek pre dlhodobu adaptované rastliny a kontrolu ..	44
5.5 Prehľadová tabuľka výsledkov	47
6. Diskusia	48
7. Záver	54
8. Zoznam použitej literatúry	56

1. Úvod

Biologické membrány patria k najdôležitejším častiam buniek. Svojou stavbou a štruktúrou umožňujú efektívne oddeliť prostredia s rôznymi vlastnosťami a zložením, napr. extra- a intracelulárne prostredie alebo vnútorné prostredie organel od cytoplazmy. Hlavnou funkciou biologických membrán je oddelenie prostredí s rôznym zložením, selektívny transport látok medzi týmito prostrediami a z toho vyplývajúca tvorba koncentračného gradientu látok. Týmto spôsobmi biologické membrány umožňujú priebeh mnohých životne dôležitých reakcií, ktoré by inak neprebiehali. Aby membrána plnila svoju úlohu správne, je dôležité, aby zostali zachované jej základné vlastnosti – selektívna priepustnosť a integrita. Vo svojej práci sa zameriavam na druhú uvedenú vlastnosť, integritu a jej možné narušenie teplotou zvýšenou nad bežný fyziologický rozsah. Názov práce preto znie „Teplom stimulovaná zmena termostability thylakoidných membrán a plazmalemy“.

Pre stanovenie stability plazmalemy vystavenej stresujúcemu faktoru je možné použiť viacero metód. Medzi najpoužívanejšie patria stanovenie poškodenia plazmalemy z nekrotickej plochy listu a konduktometrické merania. Metóda nekrotickej plochy je staršia a prekonaná metóda pre svoju zdĺhavosť (rádovo dni). Konduktometrická metóda, pri ktorej je vzorka ponorená do merného média s konštantnou teplotou je účinná a dobre reprodukovateľná pre stanovenie poškodenia biologických membrán. Je založená na meraní mernej vodivosti κ [$\text{S}\cdot\text{m}^{-1}$] média, v ktorom je vzorka ponorená. Jej časová náročnosť je prijateľná (rádovo hodiny). Vo svojej bakalárskej práci som skúmal závislosť mernej vodivosti média na teplote počas lineárneho ohrevu (CTC – conductivity temperature curve). CTC krivka je charakteristická svojím „zalomeným“ tvarom – najdôležitejším bodom je kritická teplota T_k , pri ktorej dochádza k dezintegrácii plazmalemy, vyliatiu iónov z bunky a tým k prudkému nárastu mernej vodivosti okolitého merného média.

Stav thylakoidnej membrány je možné stanoviť z fluorescenčnej teplotnej krivky (FTC). Ide o indikátor neschopnosti „*in vivo*“ chloroplastov využiť absorbované kvantum energie na fotochemické reakcie fotosyntézy. Absorpcia kvanta žiarenia je pasívny proces, excitácia je následne prenášaná pigmentmi anténnych štruktúr do reakčného centra (RC). Ak je prenos blokovaný alebo zahltený nadmerným množstvom excitácií, dochádza k opätovnej deexcitácii. Jednou z foriem deexcitácie je práve fluorescencia. Pri meraní FTC lineárne zahrievame médium, v ktorom je vzorka ponorená a vzorku ožarujeme slabým svetlom. Priebeh FTC krivky je charakteristický prvým a druhým maximom intenzity fluorescencie. Z hodnôt teploty a intenzity fluorescencie v týchto bodoch vieme určiť, aké deštrukčné procesy v thylakoidnej membráne prebehli. Fluorescenčná teplotná krivka je zároveň dobre preskúmaná a popísaná v publikáciách členov Katedry biofyziky.

Vo svojej diplomovej práci sa zaoberám súčasným meraním mernej vodivosti média a intenzity fluorescencie počas lineárneho ohrevu, ktoré nepriamo poukazujú na poškodenie plazmalemy a thylakoidnej membrány. Hlavnou úlohou je preskúmanie efektu predhrievania a pôsobenie inhibítorov DCMU resp. bromoxynilu na zmenu termostability v závislosti na intenzite použitého meracieho svetla.

2. Prehľad problematiky

2.1 Zloženie, štruktúra a termostabilita plazmalemy

Základným stavebným prvkom všetkých biologických membrán je dvojvrstva polárnych lipidových molekúl, prevažne fosfolipidov. Membránové lipidy sú molekuly s amfipatickou povahou – skladajú sa z dvoch hydrofóbných reťazcov a jedného hydrofilného jadra. Jadro je vždy orientované smerom k vonkajšiemu prostrediu. Hydrofóbné reťazce mastných kyselín sa naopak snažia styku s vonkajším prostredím vyhnúť a sú teda orientované smerom do vnútra dvojvrstvy. Mastná kyselina v polohe 2 obvykle obsahuje dvojitú väzbu v konformácii *cis*. To spôsobuje zahnutie inak lineárneho reťazca. Interakcia medzi reťazcami mastných kyselín je tak oslabená a membrána sa stáva tekutejšou – má väčšiu fluiditu. Naopak fosfolipidy, ktoré obsahujú dlhšie nasýtené reťazce mastných kyselín dodávajú membráne väčšiu rigiditu. V týchto miestach potom dochádza k väzbe transmembránových proteínov a glykolipidov.

Molekuly fosfolipidov sú medzi sebou viazané len slabými hydrofóbnymi väzbami. Určujú tak základné fyzikálne vlastnosti biologických membrán – priepustnosť a fluiditu membrány. Lipidová dvojvrstva prepúšťa molekuly v závislosti na ich veľkosti a polarite. Čím je molekula menšia a lipofilnejšia (menej polárna), tým ľahšie prestupuje cez membránu. Najpriepustnejšia je membrána pre malé molekuly bez náboja (O_2 , CO_2), o niečo menej pre vodu a pre malé nepolárne organické molekuly (močovina, glycerol). Priepustnosť potom prudko klesá s veľkosťou molekuly, takže pre veľké organické molekuly sú potrebné proteínové prenášače. Rovnako potrebné sú aj pre polárne molekuly bez ohľadu na ich veľkosť, napr. ióny Na^+ , K^+ , Cl^- . Polárne molekuly cez membránu samovoľne neprenikajú.

Funkčnou zložkou membrány sú proteíny, ktoré sú zodpovedné za jej semipermeabilitu. Naprieč membránou sa tak môže vytvoriť koncentračný gradient. Ten sa následne využíva ako zdroj energie, napr. pri tvorbe ATP (gradient protónov H^+).

Fluidita a možnosti jej regulácie umožňujú bunkám odolávať zvýšeným alebo zníženým teplotám mimo fyziologický rozsah. Fluidita membrány závisí predovšetkým na usporiadaní a interakciách reťazcov mastných kyselín v membránových fosfolipidoch. Dlhé reťazce nasýtených mastných kyselín sa pôsobením Van der Waalsových síl zhlukujú tesne a pevne, takže vytvárajú rigidné štruktúry (fluidita je vo veľkej miere obmedzená). Nenasýtené mastné kyseliny v *trans* konfigurácii majú lineárny tvar podobne ako nasýtené mastné kyseliny. So zvyšovaním teploty dochádza k zmene dvojných uhlíkových väzieb z *trans* konfigurácie na *cis* konfiguráciu. V tejto konfigurácii jednotlivé reťazce k sebe nepriliehajú tak tesne a štruktúra sa stáva viac fluidnou. K zmene fluidity dochádza, ak teplota dosiahne teplotu topenia (T_m – ang. *melting temperature*). Tá je tým vyššia, čím dlhší je reťazec mastnej kyseliny. Nenasýtené mastné kyseliny so svojou *cis* konfiguráciou sa nemôžu približovať tak blízko, takže vytvárajú fluidnejšie štruktúry. Preto čím viac dvojitých väzieb, tým nižšia je T_m a tým vyššia fluidita membrány. Saturáciou nenasýtených väzieb v uhlíkovom reťazci hydrofóbných častí fosfolipidových molekúl protónmi membrána zvyšuje svoju rigiditu, a tak aj odolnosť voči vyšším teplotám.

2.2 Praktické stanovenie termostability membrán

Pre stanovenie stability plazmalemy vystavenej stresujúcemu faktoru je možné použiť viacero metód. Medzi najpoužívanejšie patria stanovenie poškodenia plazmalemy z nekrotickej plochy listu a konduktometrické merania. Metóda nekrotickej plochy je staršia a prekonaná metóda pre svoju zdĺhavosť (rádovo dni). Po

vystavení vzorky (najčastejšie celý list) stresovému faktoru je vzorka inkubovaná po dobu niekoľko dní vo fytokomore. Následne sa vyhodnocuje pomer nekrotickej plochy poškodenej stresovým faktorom k celkovej ploche listu. Hlavnou výhodou metódy je univerzálnosť – stresový faktor môže byť abiotický (zvýšená alebo znížená teplota, zvýšené ožiarenie, chemikálie, inhibítor, ...) alebo biotický (napr. viróza, hubový patogén, parazit a pod.). Hlavnými nevýhodami je časová náročnosť a prístrojová náročnosť na inkubáciu a presné vyhodnotenie miery poškodenia.

Konduktometrická metóda je účinná a dobre reprodukovateľná pre stanovenie poškodenia biologických membrán. Vzorka (najčastejšie segment listu) je vystavená stresovému faktoru a následne ponorená do merného média s konštantnou teplotou. Poškodenie biologických membrán vyvolané stresovým faktorom má za následok uvoľnenie iónov zo vzorky do merného média. Poškodenie sa určuje porovnaním mernej vodivosti κ [$\mu\text{S}\cdot\text{m}^{-1}$] média pre kontrolné vzorky a vzorky vystavené stresovému faktoru. Ako médium sa používa destilovaná resp. deionizovaná voda, pre malú hodnotu mernej vodivosti, ktorá neovplyvňuje meranie. Konduktometria je jednoduchá a dobre reprodukovateľná metóda na stanovenie miery poškodenia biologických membrán. Zároveň pri nej môžeme v krátkom časovom intervale spracovať veľké množstvo vzoriek (Srinivasan A. a kol. 1996). V porovnaní s metódou nekrotickej plochy je konduktometrická metóda rýchlejšia, stále je však časovo náročná kvôli manipulácii so vzorkami.

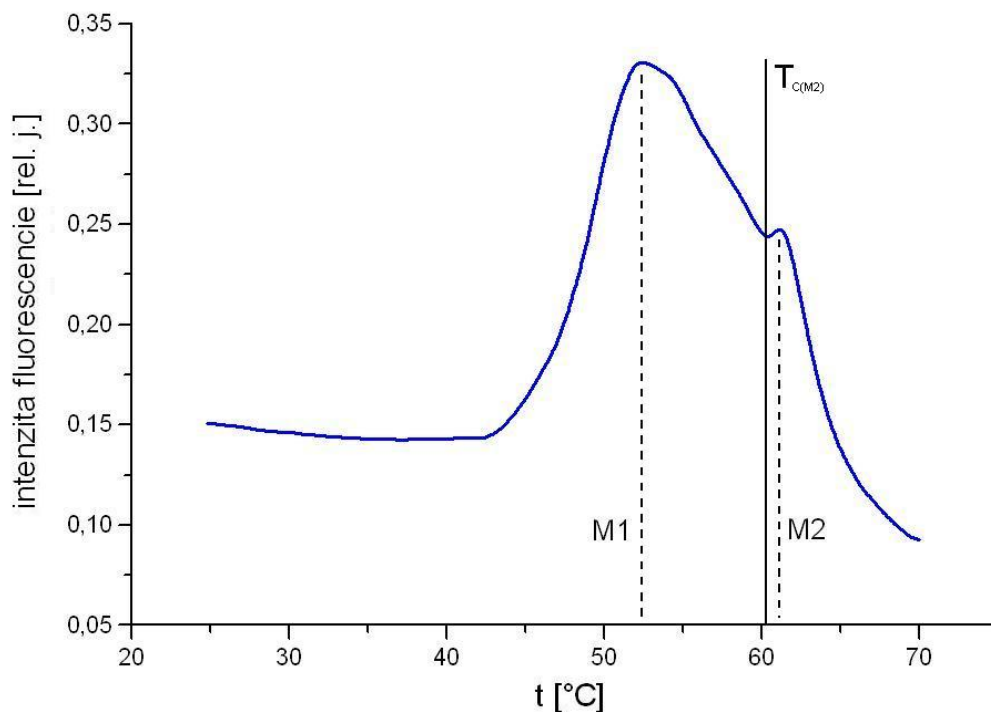
Vo svojej bakalárskej práci som sa venoval hľadaniu optimálnej a časovo menej náročnej metódy pre stanovenie termostability plazmalemy. Na základe rešerše danej problematiky a experimentov vo vlastnej práci bola ako časovo najpriateľnejšia vyhodnotená metóda stanovenia závislosti mernej vodivosti média na teplote počas lineárneho ohrevu (CTC – conductivity temperature curve). Ide o stanovenie kritickej teploty T_k , pri ktorej dochádza k dezintegrácii plazmalemy, vyliatiu iónov z bunky a tým k prudkému nárastu mernej vodivosti okolitého merného média.

Oproti iným metódam, ako napr. stanovenie nekrotickej plochy listu po pôsobení stresového faktoru (Bilger a kol. 1984) alebo teploty T_{50} , ktorá spôsobí smrť 50% rastlín (Gulen a Eris, 2003), je CTC nenáročná metóda. Z priebehu teplotnej krivky mernej vodivosti (obr. 9) možno ihneď po nameraní stanoviť približnú kritickú teplotu T_k bez potreby ďalších výpočtov. Pri tejto teplote plazmalema praská a merná vodivosť prudko vzrastá. Prostredníctvom matematického aparátu je možné túto teplotu definovať presne ako bod maximálnej krivosti CTC krivky.

Súčasne s termostabilitou plazmalemy je možné počas lineárneho ohrevu stanovovať aj termostabilitu thylakoidnej membrány. Stav thylakoidnej membrány je možné stanoviť z fluorescenčnej teplotnej krivky (FTC – *ang.* - fluorescence temperature curve). Absorpcia kvanta žiarenia a jej prenos pigmentami anténnych štruktúr do reakčného centra (RC) je pasívny proces. Ak je prenos blokovaný alebo je RC zahŕtené nadmerným množstvom excitácií, môže dochádzať k vzniku reaktívnych foriem kyslíku (ROS – *ang.* – reactive oxygene forms). Ochranným mechanizmom pred vznikom ROS je práve fluorescencia. Pri meraní FTC vzorku lineárne zahrievame a ožarujeme slabým svetlom. Priebeh FTC je charakterizovaný parametrami: M_1 , T_{M1} resp. M_2 , T_{M2} – prvé resp. druhé maximum intenzity fluorescencie a teplota, pri ktorej k nemu dochádza a $T_{c(M2)}$ – kritická teplota pre termostabilitu pigment-proteínových komplexov v thylakoidnej membráne. Z hodnôt teploty a intenzity fluorescencie v týchto bodoch vieme určiť, ktoré deštruktívne procesy na thylakoidnej membráne nastali. FTC krivka teda vypovedá o neschopnosti „*in vivo*“ chloroplastov využiť absorbované kvantum energie na fotochemické reakcie fotosyntézy.

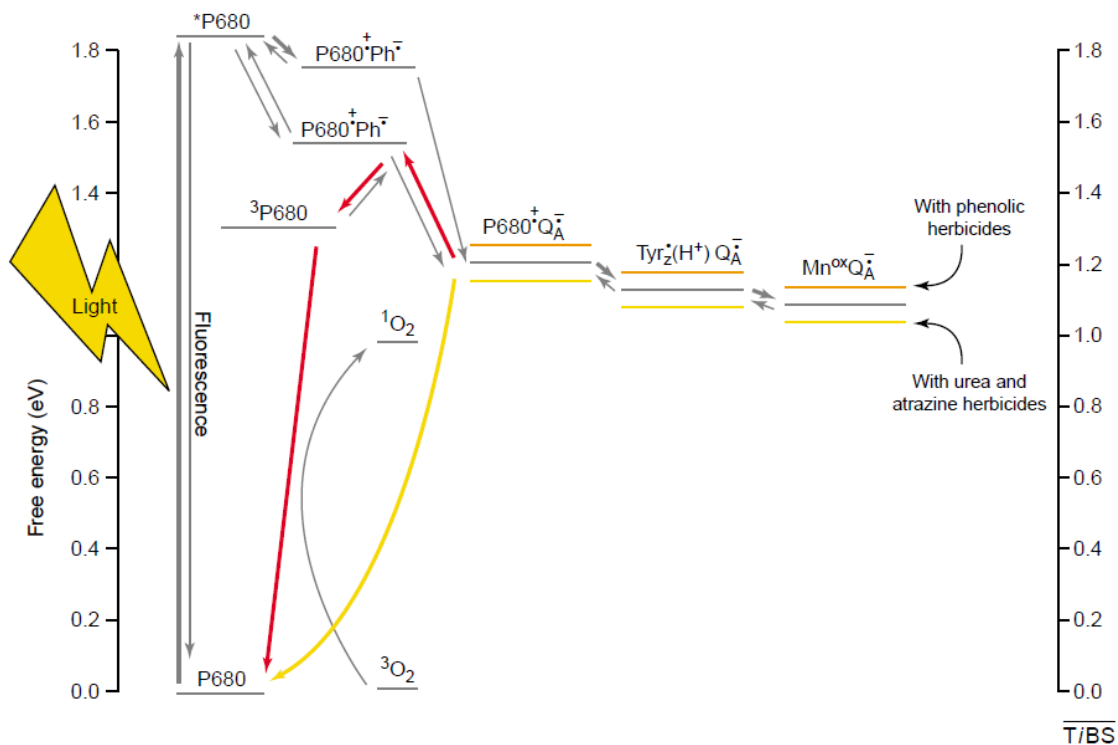
Fluorescenčná teplotná krivka znázorňuje intenzitu fluorescencie v relatívnych jednotkách v závislosti na teplote (obr. 1). Pre zmenu teploty sa používa lineárny ohrev s rýchlosťami $0,5^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, $1^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, $2^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ a $4^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$. Počiatočný nárast FTC do maxima M_1 je zapríčinený blokováním reakčných centier PSII. Pokles za maximom

M_1 do lokálneho minima je prisudzovaný teplotnej závislosti fluorescencie molekúl chl *a*. Opätovný nárast do maxima M_2 je vysvetľovaný tepelnou denaturáciou pigment proteínových komplexov (PPC) a stratou stability thylakoidnej membrány (Ilík, 2002). Teploty maxim M_1 a M_2 je možné použiť k odhadu termostability thylakoidných membrán, resp. fotosystému II (PSII) (Bilger a kol. 1984). Pre termostabilitu thylakoidnej membrány je určujúca teplota $T_{c(M1)}$, pri ktorej dochádza k nárastu intenzity fluorescencie do prvého maxima M_1 (Nauš a Ilík, 1997). Bolo zistené, že maximá M_1 a M_2 menia svoju polohu v závislosti na zvolenej rýchlosti lineárneho ohrevu. Pri použití vyššej rýchlosti lineárneho ohrevu dochádza k posuvu maxim M_1 a M_2 smerom do vyšších teplôt (Kuropatwa a kol. 1992). Dezintegrácia thylakoidnej membrány nie je závislá len na okamžitej teplote, ale aj na celkovej kritickej teplotnej dávke, ktorej membrána dokáže odolať. Táto dávka je rýchlejšie dosiahnutá pri nižších rýchlostiach ohrevu. Pri zvýšení rýchlosti ohrevu dochádza k dosiahnutiu kritickej teplotnej dávky neskôr a teda aj pri vyšších teplotách.



Obr. 1. Fluorescenčná teplotná krivka (FTC) pre jačmeň jarný (*Hordeum vulgare*) pre rýchlosť lineárneho ohrevu $0,5^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ so znázornenou kritickej teplotou $T_{c(M2)}$ a maximami M_1 a M_2 .

Krivka FTC môže mať rôzny priebeh v závislosti na fyziologickom stave skúmanej vzorky. Tento stav je možné zmeniť chemickými látkami blokujúcimi elektrónové prenášače fotosystému PSI alebo PSII. Chemikália DCMU, 3-(3',4'-dichlórfenyl)-1,1-dimetyl močovina, blokuje prenos elektrónov medzi chinónovými prenášačmi Q_A a O_B v PSII. Blokovanie elektrónového transportu silne ovplyvňuje tvar FTC krivky, zvlášť pri aktinickom svetle (Kouřil a kol. 2002). Nárast fluorescencie je spôsobený postupnou teplotnou inhibíciou rekombinačných procesov brániacich akumulácii redukovaného Q_A pri izbovej a mierne zvýšenej teplote. V prípade vzoriek infiltrovaných DCMU majú tieto procesy pravdepodobne nižšiu kapacitu a dochádza k ich zahlteniu už pri excitácii svetlom s nižšou intenzitou. Nárast fluorescencie do maxima M_1 počas lineárneho ohrevu v prípade vzoriek nasýtených DCMU je spôsobený termálnou inhibíciou rekombinácie $S_2Q_A^-$. Inhibícia rekombinácie $S_2Q_A^-$ vedie k akumulácii redukovaného Q_A^- a zatváraniu reakčných centier PSII. K uzatvoreniu reakčných centier PSII môže okrem svetlom-indukovanej redukcie Q_A viesť aj spätný prenos elektrónov z Q_B na Q_A . Spätný prenos elektrónov z Q_B na Q_A je spôsobený teplom vyvolanou konverziou Q_B -redukujúcich centier na Q_B -neredukujúce centrál (Cao a Govindjee 1990). Inhibícia tejto rekombinácie pri teplote okolo 40°C je spôsobená inhibíciou komplexu vyvíjajúceho kyslík (OEC). Inhibícia OEC bolo pozorovaná pri teplotách nad 35°C (Havaux a Gruszecki 1993; Havaux 1998; Pospíšil a Tyystjärvi 1999).



Obr. 2. Schéma nábojovej rekombinácie vo fotosystéme II. Herbicídy naviazané v mieste sekundárneho chinónového prenášača Q_B bránia elektrónovému transportu medzi chinónovými prenášačmi Q_A a Q_B . Bromoxynil znižuje redoxný potenciál Q_A o približne 50mV, oproti tomu DCMU zvyšuje redoxný potenciál Q_A o približne 50-55 mV. Obrázok je prevzatý z publikácie Rutherford a Liszkay (2001).

2.3 Zloženie, štruktúra a termostabilita thylakoidnej membrány

2.3.1 Fázové prechody lipidov

Thylakoidná membrána vyšších rastlín v porovnaní s inými biologickými membránami obsahuje vysoký obsah proteínov v pomere k lipidom. Medzi významné proteínové komplexy patria:

- reakčné centrá fotosystému II (RC PSII) a ich pigment-proteínové komplexy svetlozberných antén (LHC PSII),
- reakčné centrá fotosystému I (RC PSI) a ich pigment-proteínové komplexy svetlozberných antén (LHC PSI),

- svetlozberné chlorofyl a/b-proteínové komplexy,
- podjednotky ATP-syntázy CF₀-CF₁ a
- cytochróm b₆f komplex.

Medzi lipidmi sú najviac zastúpené galaktolipidy, konkrétne monogalactosyl- (MGDG) a digalactosyl- (DGDG) diacylglycerol. Ich hmotnostný podiel je až 75% zo všetkých lipidov (Nishihara a kol. 1980). MGDG je charakteristický nenasýtenými acylovými reťazcami s viac ako 6 dvojitými *cis* väzbami. Vo vodnom roztoku MGDG, na rozdiel od ostatných membránových lipidov, nevytvára konvenčnú lipidovú dvojvrstvu, ale formuje sa do hexagonálnych micel (obr. 3). Je to dané kónickým tvarom molekuly (Brentel a kol. 1985). V odbornej literatúre je tento jav označený ako „lipid, ktorý netvorí membránovú dvojvrstvu“ (*ang.* NBFL - non-bilayer forming lipid). Vytvorenie dvojvrstvy je však možné postupnou saturáciou dvojitých *cis* väzieb hydrogenáciou protónmi H⁺ (Quinn 1987).



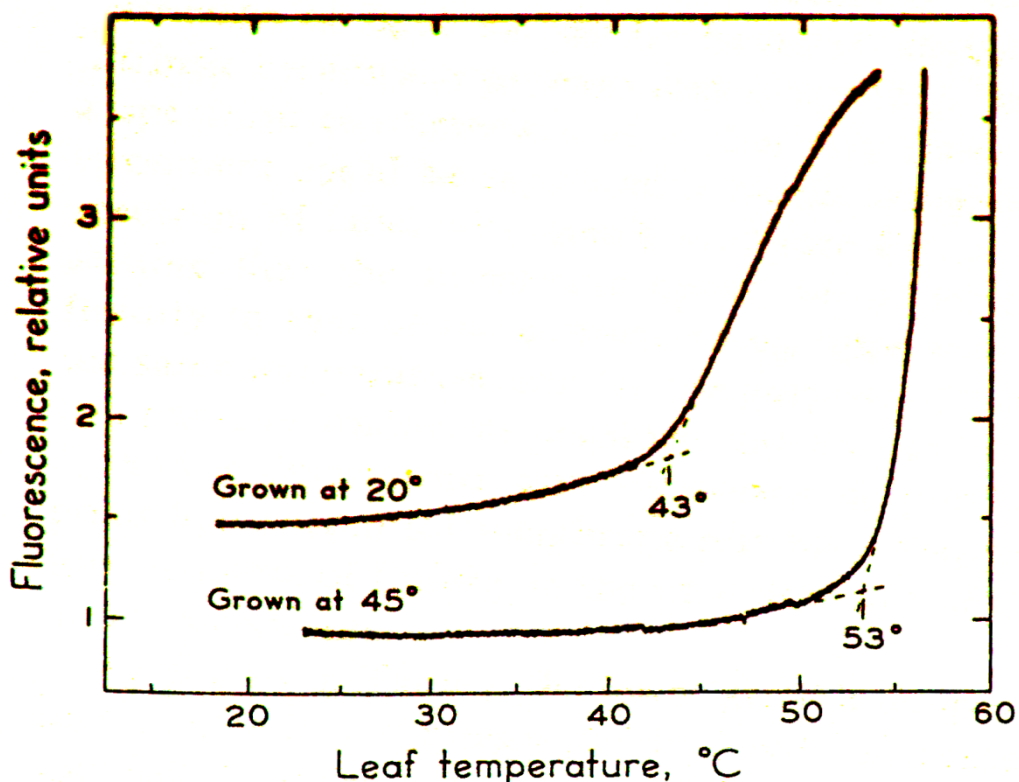
Obr. 3. Faktory ovplyvňujúce fázový prechod polárnych lipidov thylakoidnej membrány vyšších rastlín. Fosfolipidová dvojvrstva sa formuje pri nižšej teplote, satureovaných reťazcoch mastných kyselín, vysokej vodnej aktivite, nízkej iónovej sile a neutrálom alebo vysokom pH. Obrázok je prevzatý z publikácie Quinn (1987).

Ďalšími faktormi ovplyvňujúcimi zoskupovanie molekúl MGDG do micel alebo do lipidovej dvojvrstvy sú teplota, aktivita vody, koncentrácia iónov a pH. Udržanie molekúl vo forme lipidovej dvojvrstvy je jednoduchšie pri vyššej aktivite vody, nižšej koncentrácii iónov a v neutrálnom alebo zásaditom prostredí (neutrálne alebo nízke pH). Rovnako nižšia teplota podporuje udržanie molekúl MGDG vo forme lipidovej dvojvrstvy. Toto tvrdenie dokladá výskum pôsobenia zvýšenej teploty na

suspenziu chloroplastov z hľadiska štruktúrnych zmien. V experimente bola suspenzia chloroplastov vystavená zvýšenej teplote po dobu 5 minút a zmeny štruktúry boli vyhodnotené z lomových plôch thylakoidnej membrány skúmanej pomocou elektrónovej mikroskopie (freeze-fracture electron microscopy). Bolo zistené, že teploty do 35°C nemajú za následok žiadne štruktúrne zmeny - chloroplasty aj graná thylakoidov zostali intaktné. Pôsobenie teplôt v rozsahu od 35°C do 45°C malo za následok rozpad grán. Teploty nad 45°C viedli k fázovej separácii NBFL lipidov, ktoré následne vytvorili stabilné micely. (Gounaris a kol. 1983)

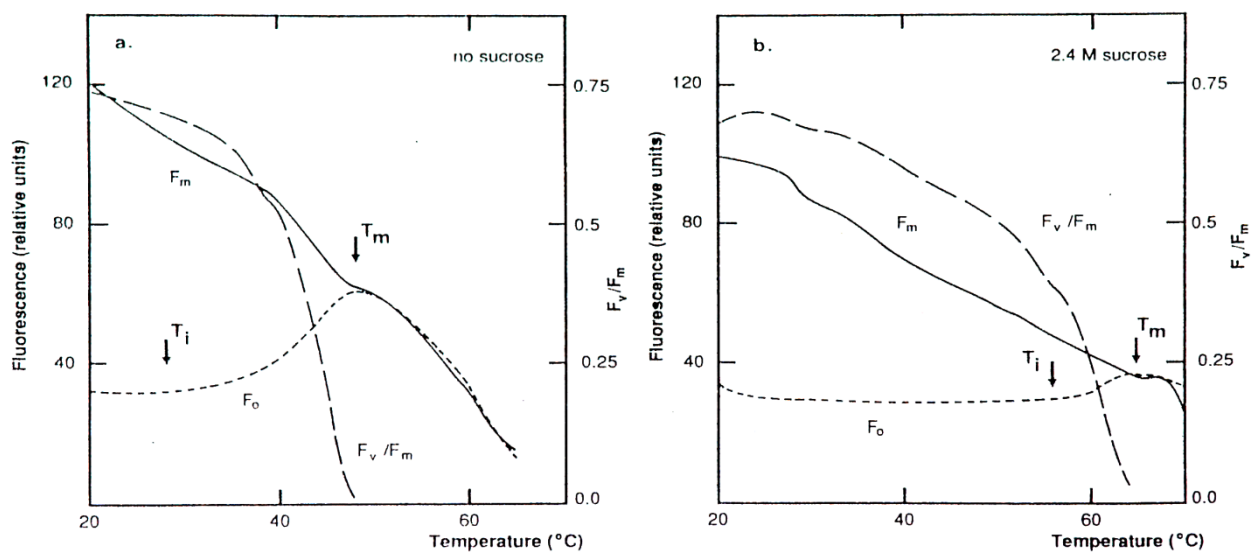
Výrazný podiel na odolnosť rastlín voči stresovým faktorom majú aj podmienky pri pestovaní. Vzorky z sukulentnej rastliny *Atriplex lentiformis* pestovanej pri teplotnom režime 43°C deň / 30° noc vykazovali zvýšenú termostabilitu v porovnaní so vzorkami z rastlín pestovaných pri teplotnom režime 23°C/18°C. Bolo zistené, že masné kyseliny membránových lipidov vykazovali nižší počet dvojitéch väzieb v prípade vzorkov z rastlín pestovaných pri zvýšených teplotách, čo viedlo k menšej viskozite membrány a zvýšenej odolnosti voči vysokým teplotám (Pearcy a kol. 1977).

K podobným výsledkom dospel aj výskum oleandra obecného (*Nerium oleander*). Časť rastlín bola pestovaná pri teplotnom režime 45°C deň / 32°C noc, druhá časť pri režime 20°C/15°C. V grafe na obr. 4 sú znázornené FTC krivky pri rýchlosti ohrevu 1°C.min⁻¹. V grafe sú vyznačené kritické teploty T_{c(M₁)} pre nárast fluorescencie do maxima M₁. Poloha týchto teplôt jasne dokazuje zvýšenú odolnosť vzoriek rastlín pestovaných pri vyšších teplotách (Raison a kol. 1982).



Obr. 4. Porovnanie FTC kriviek pri rýchlosti ohrevu $1^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ pre vzorky oleandra obecného pestovaného pri 20°C resp. 45°C . Rozdiely v kritickej teplote $T_{c(M1)}$ nárastu do maxima M_1 dokazujú vyššiu termostabilitu rastlín pestovaných pri 45°C . Obrázok je prevzatý z publikácie Raison a kol. (1982).

Výrazný vplyv na fázovú separáciu lipidov má koncentrácia rozpustných látok v bunke. Bolo zistené, že prídanie sacharózy vo vysokej koncentrácii viedlo vo veľkej miere k fázovej separácii NBFL lipidov z thylakoidnej membrány (Williams a kol. (1990). Predchádzajúce štúdie s chloroplastami vystavenými tepelnému stresu ukázali, že fázová separácia NBFL lipidov je sprevádzaná fyzickým oddelením svetlo-zberných antén a reakčných centier fotosystému II (Armond a kol. 1980, Gounaris a kol. 1984)



Obr. 5. Porovnanie vplyvu sacharózy na tvar FTC kriviek pre suspenziu chloroplastov pri rýchlosti ohrevu $2^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$. Graf vľavo znázorňuje kontrolné vzorky, graf vpravo vzorky po pridaní sacharózy v koncentrácii 2,4M. Na grafoch je jasne vidieť posun maxima M1 smerom do vyšších teplôt. Obrázok je prevzatý z publikácie Williams a kol.

Vysoké koncentrácie sacharózy majú za následok posun teploty $T_{c(M1)}$ a T_{M1} smerom do vyšších teplôt, a to až o desiatky stupňov. Pri koncentrácii sacharózy 2,4M dochádza k posunu teploty $T_{c(M1)}$ z 28°C na 56°C a teploty T_{M1} z teploty 48°C na 64°C ! Výsledky prezentované na obrázku 4 dokazujú, že prítomnosť vhodných rozpustných látok vedie k podstatnému zvýšeniu kritickej teploty $T_{c(M1)}$ (Williams a kol. 1992).

Fázový prechod MGDG je možné vyvolať rôznymi spôsobmi - zvýšenou teplotou, zvýšenou koncentráciou iónov, nižším pH. Fázový prechod MGDG zvyšuje stabilitu tylakoidnej membrány. Membrána bez MGDG neobsahuje také množstvo nenasýtených dvojitych väzieb, a tým sa stáva rigidnejšou, v porovnaní s membránou s MGDG. (Kóta a kol. 2002)

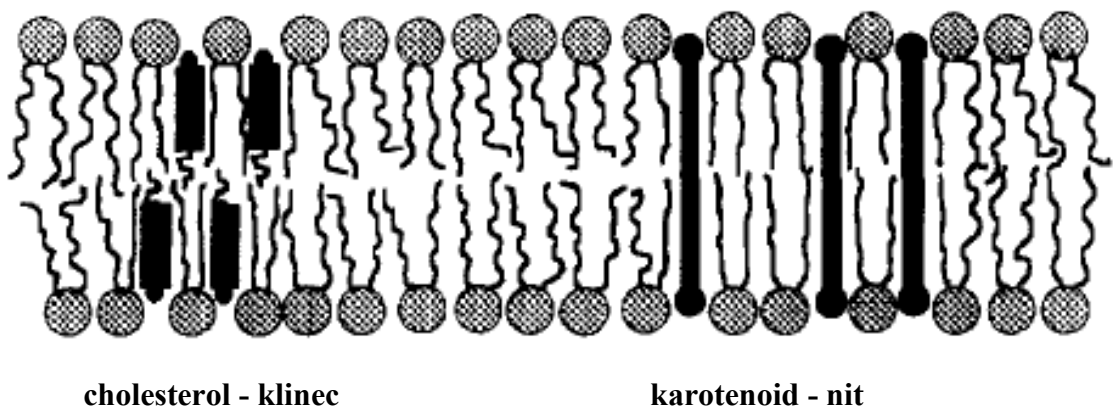
2.3.2 Xantofylový cyklus a jeho ochranné funkcie

V porovnaní s plazmalemou, termostabilitu thylakoidnej membrány ovplyvňuje prítomnosť niektorých pigmentov fotosyntetického aparátu. Jedná sa hlavne o xantofyly. Xantofyl violaxantin viazaný v pigment-proteínových komplexoch fotosystémov plní štruktúrnu a svetlo-zbernú funkciu. Dvojitá deepoxidácia violaxantinu cez antheraxantin na zeaxantin je účinný spôsob ochrany biologických makromolekúl pred aktívnymi formami kyslíka (ROS). ROS môžu vznikáť v RC pri nadmernom ožiarení rastliny (napr. Liszkay 2004). S nadmerným ožiarением rastliny sa spája aj zvýšená teplota. Ku zvyšovaniu teploty dochádza priamo fyzikálnym pôsobením žiarenia alebo tepelnou disipáciou nadmerného počtu excitácií v RC (Young a kol. 1997).

Pri náhlom vystavení rastliny jasnému svetlu prebehnú v svetlo-zberných komplexoch konformačné zmeny, ktoré umožnia violaxantinu lepší difúzny pohyb naprieč membránou. Violaxantin sa tak môže dostať do priameho kontaktu s deepoxidázou, ktorá sa nachádza na lumenárnej strane membrány. Pri kontakte violaxantinu s deepoxidázou dochádza k deepoxidácii na antheraxantin. Pri zvýšenej fluidite membrány sa molekula antheraxantinu môže otočiť epoxidovou skupinou do lumenárnej strany (tzv. flip-flop), epoxidová skupina sa opäť dostane do kontaktu s deepoxidázou na lumenárnej strane a antheraxantin je tak deepoxidovaný na zeaxantin (Havaux a Gruszecki 1993). Zvýšená ožiarenosť teda spôsobuje premenu violaxantinu na zeaxantin a práve zeaxantin slúži ako regulátor fluidity thylakoidnej membrány.

Neviazaný zeaxantin následne interaguje s lipidmi obsiahnutými v membráne. Veľkosť molekuly zeaxantinu zodpovedá približne hrúbke thylakoidnej membrány (cca 30 Å). Zeaxantin je ukotvený v polárnych častiach fosfolipidov na vonkajších stranách membrány a pozdĺžna osa molekuly zeaxantinu je kolmá na povrch membrány. Svojím ukotvením zeaxantin znižuje fluiditu thylakoidnej membrány.

Membránové terpenoidy môžu posilniť a stabilizovať membránu 2 spôsobmi – „klinec“ (ang. “nail“) alebo „nit“ (ang. “rivet“) – schéma na obrázku 6. Vo väčšine eukaryotických membrán pôsobia steroly, napr. cholesterol, ako „klinec“ – tzn. zasahujú len do jednej vrstvy fosfolipidov (od povrchu do polovice membrány). Hydroxylové skupiny molekúl cholesterolu vytvárajú väzby s hydrofilnou hlavičkou fosfolipidov. Rozmery molekuly cholesterolu umožňujú aj vytvorenie slabých Van der Waalsových väzieb. Tie viažu molekuly cholesterolu k fosfolipidovej dvojvrstve membrány a zvyšujú tak jej stabilitu (Havaux 1998).



Obr. 6. Stabilizácia membrány molekulami cholesterolu (spôsob „klinec“) a karotenoidmi (spôsob „nit“). Obrázok je prevzatý z publikácie Havaux (1998).

V membránach, ktoré neobsahujú cholesterol (napr. thylakoidné membrány) môžu stabilizačnú funkciu cholesterolu zastávať iné terpenoidy alebo karotenoidy. Bipolárne karotenoidy, ako napr. zeaxantin, pôsobia ako „nit“ – svojím ukotvením v polárnych častiach fosfolipidov na vonkajších stranách membrány stabilizujú fosfolipidovú dvojvrstvu, a tým znižujú fluiditu membrány.

S využitím elektrón-spinovej rezonančnej spektroskopie (ESR) bolo zistené, že thylakoidné membrány extrahované z osvetlených rastlín mali vyšší obsah zeaxantínu a vykazovali podstatne nižšiu fluiditu v porovnaní s membránami extrahovanými z rastlín adaptovaných na tmu (Tardy a Havaux (1997)).

3. Cieľ práce

Hlavným cieľom predkladanej diplomovej práce je porovnanie metód pre stanovenie teplom stimulovanej zmeny termostability thylakoidných membrán a plazmalemy. Termostabilita vzoriek je testovaná v rozsahu teplôt od 25°C do 65°C pri rýchlosti lineárneho ohrevu 1°C.min⁻¹.

Pre meranie FTC je použité meracie svetlo s intenzitou 10, 5, 1 a 0,1 μmol fotónov.m⁻².s⁻¹. Rôzna intenzita svetla má za následok zmenu redoxného potenciálu Q_A, a tak ovplyvňuje tvar FTC krivky pri náraste do maxima M₁. Redoxný potenciál Q_A je možné ovplyvniť aj pomocou inhibítorov elektrónového transportu. Pre zníženie redoxného potenciálu Q_A je použitý inhibítor bromoxynil, pre zvýšenie redoxného potenciálu Q_A je použitý inhibítor DCMU.

Termostabilita plazmalemy a thylakoidnej membrány je skúmaná pre kontrolné vzorky, vzorky infiltrované DCMU alebo bromoxynilom, vzorky predhriate na 35°C a pre vzorky zároveň infiltrované a predhriate na 35°C. Všetky merania sú realizované v troch opakovaníach. Termostabilita thylakoidnej membrány je vyhodnocovaná z FTC, termostabilita plazmalemy z CTC. Kritická teplota termostability plazmalemy T_k je stanovená ako teplota, pri ktorej má krivka CTC maximálnu krivosť. Pri tejto teplote dochádza k najväčšiemu vyliatiu iónov do merného média. Predpokladáme teda, že pri tejto teplote dochádza k úplnej dezintegrácii plazmalemy. Kritická teplota termostability pigment-proteínových komplexov v thylakoidnej membráne T_{c(M2)} je definovaná ako lokálne minimum pred nárastom intenzity fluorescencie do druhého maxima. Dielčou úlohou je porovnať kritickú teplotu T_k teplotnej krivky mernej vodivosti média s kritickou teplotou T_{c(M2)} fluorescenčnej teplotnej krivky a namerané výsledky diskutovať s ohľadom na doteraz publikované práce iných autorov.

4. Materiál a metódy

4.1 Rastlinný materiál

Ako rastlinný materiál bol použitý jačmeň jarný (*Hordeum vulgare*). Rastliny boli pestované vo fytokomore v miskách s perlitom a zalievané Knopovým živným roztokom. Fytokomora CX2000 (Yokogawa, Japonsko) bola nastavená na režim osvetlenia 16h svetlo / 8h tma s intenzitou $(100 \pm 10) \mu\text{mol fotónov.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ pri teplote $(24 \pm 2) ^\circ\text{C}$ a relatívnej vlhkosti vzduchu $(50 \pm 10)\%$. Pre meranie boli ako vzorky použité segmenty primárnych listov 7 dní starých rastlín. Pred meraním bola rastlina po dobu 15 minút adaptovaná na tmu a pre meranie bola ako vzorka použitá vždy stredná časť primárneho listu dlhá 2cm a odstrihnutá nožmicami.

Pre test dlhodobej adaptácie rastlín na zvýšenú teplotu bol uskutočnený samostatný experiment. Prvé 4 dni boli všetky rastliny pestované pri teplote 25°C . Posledné 3 dni boli vybrané rastliny presunuté do prostredia s teplotou 35°C a kontrolné rastliny naďalej pestované pri teplote 25°C . Ostatné podmienky boli zachované podľa popisu v predchádzajúcom odstavci.

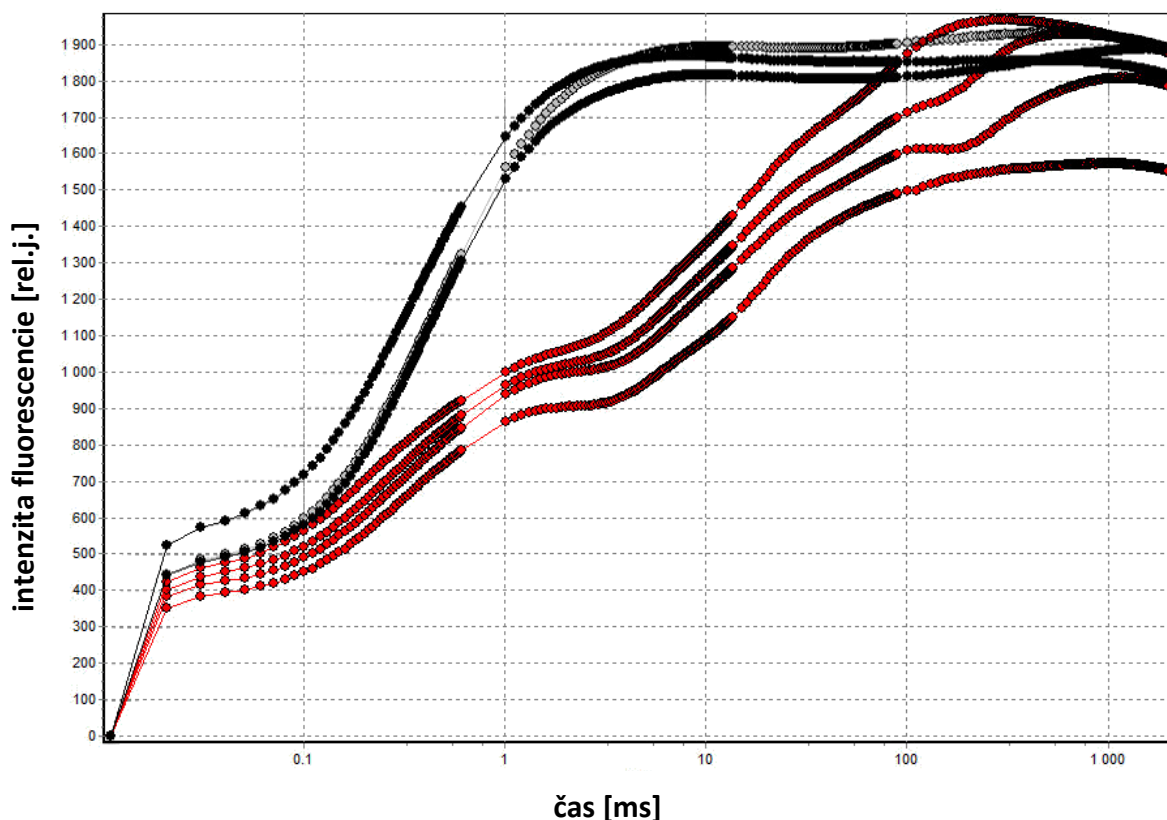
4.2 Príprava vzoriek

Predhrievanie vzoriek (2cm dlhých segmentov primárnych listov) bolo realizované ich ponorením do vodného kúpeľa v termostate predhriatom na 35°C po dobu 90 minút.

Pre inhibíciu elektrónového transportu medzi prenášačmi Q_A a Q_B boli použité inhibítorm DCMU (3-(3',4'-dichlórfenyl)-1,1-dimetyl močovina) resp. bromoxynil. Infiltrácia inhibítorom bola realizovaná v tme ponorením vzorkov do $20 \mu\text{M}$ roztoku

DCMU resp. do 20 μM roztoku bromoxynilu. Použitý roztok bol pripravený riedením zásobného roztoku s deionizovanou vodou v pomere 1:99. Koncentrácia zásobného roztoku bola 2 mM DCMU resp. 2mM bromoxynilu v ethanole. Infiltrácia inhibítora do vzorky bola overená na prístroji FluorPen FP 100 (Photon System Instruments, Česká republika) meraním fluorescenčného indukčného javu (obr. 7).

Fluorescenčný indukčný jav (FIJ) znázorňuje závislosť intenzity fluorescence v čase. Fluorescencia je detekovaná zo vzorky adaptovanej na tmu, ktorá bola náhle ožiarená svetlom. Krivka FIJ má niekoľko charakteristických vln a lokálnych maxím. Typický priebeh FIJ pre niekoľko kontrolných vzoriek (neinfiltrovaných inhibítorm) na obr. 7 reprezentuje niekoľko vybraných červených kriviek. Stanovenie FIJ sa používa pre kontrolu dostatočnej infiltrácie inhibítora do vzoriek. Čierne krivky reprezentujú infiltrované vzorky. Maximum intenzity fluorescence bolo dosiahnuté v J fáze (Lazár a kol. 1998, Lazár a Pospíšil 1999).



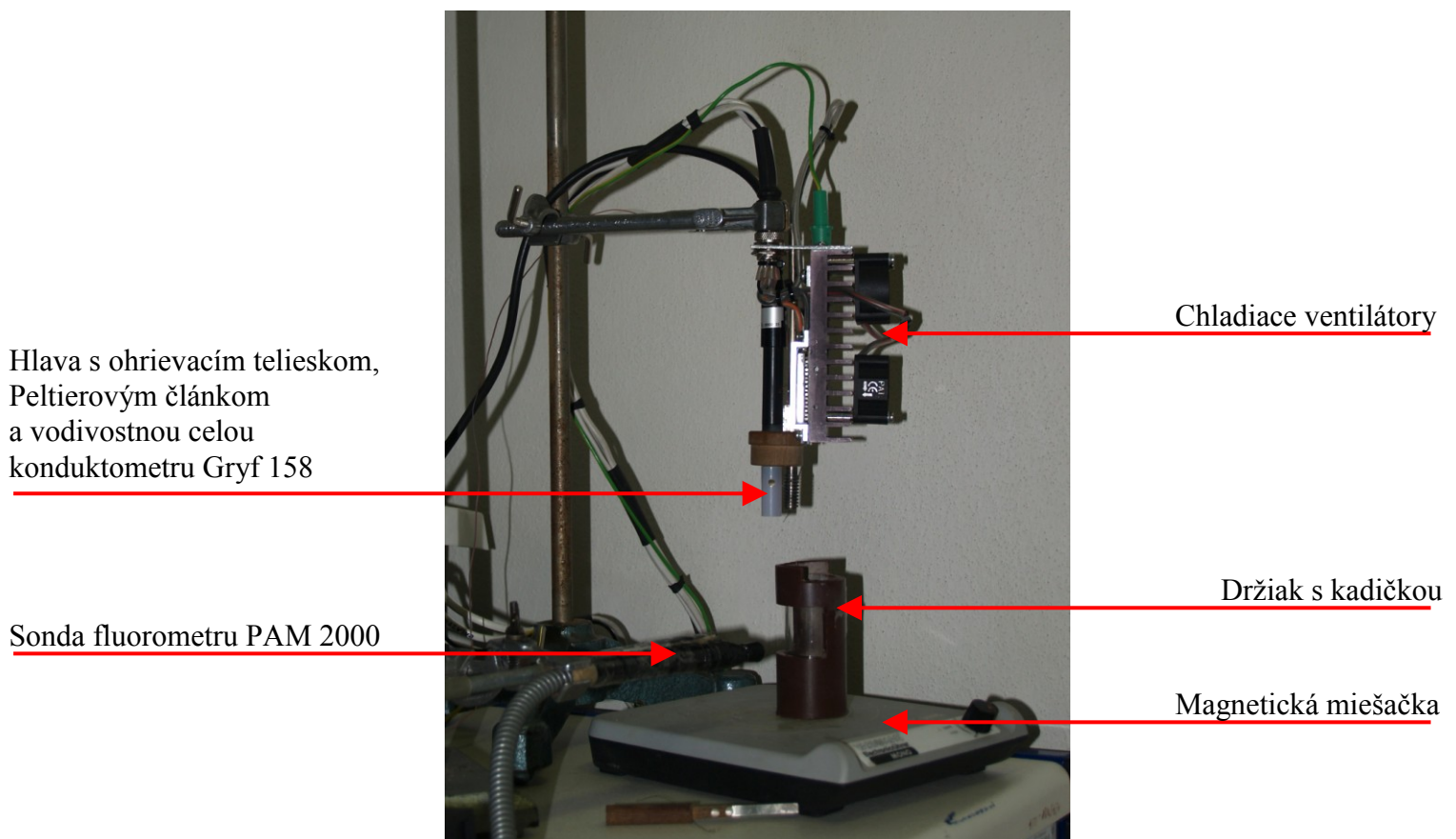
Obr. 7. O-J-I-P krivka fluorescenčného indukčného javu pre vzorky infiltrované 20 μM DCMU po dobu 90 minút (čierne krivky) a pre kontrolné vzorky infiltrované v 20 μM etanole po dobu 90 minút (červené krivky). Dostatočná infiltrácia DCMU je dokázaná dosiahnutím maxima intenzity fluorescencie v J fáze v čase 2ms (Lazár a kol. 1998, Lazár a Pospíšil 1999). Pre názornosť je prezentovaných niekoľko kriviek pre infiltrované a kontrolné vzorky.

Pre meranie FTC a CTC boli vzorky ponorené do kyvety so 17,5ml deionizovanej vody a médium bolo lineárne ohrevané z teploty 25°C na teplotu 65°C rýchlosťou 1°C.min⁻¹. Meranie bolo uskutočnené pre vzorky infiltrované DCMU, vzorky predhriate na 35°C, vzorky infiltrované DCMU a následne predhriate na 35°C a pre kontrolné vzorky bez DCMU a bez predhriatia.

4.2 Popis aparátúry

Meranie prebiehalo na aparátúre (detail na obr. 8) vyrobenej v laboratóriu Oddelenia biofyziky Přírodovědeckej fakulty Univerzity Palackého. Vzorka bola

pripevňovaná na držiak a bola ponorená do kadičky s merným médiom – deionizovanou vodou. Rovnomerné premiešavanie, dôležité pre udržanie rovnej teploty v celom objeme média, bolo zabezpečené magnetickou miešačkou. Súčasťou aparatury bol prístroj Gryf 158 (Gryf HB spol. s.r.o., Česká republika) pre stanovenie mernej vodivosti média a prístroj PAM 2000 (Heinz Walz GmbH, Nemecko) pre meranie intenzity fluorescencie. Tá bola stanovovaná z vrchnej časti listu. Ohrev bol zabezpečený ohrevným telieskom ponoreným v médiu a chladenie Peltierovým článkom. Ten bol umiestnený na vrchnej strane ohrevného telieska mimo médium a chladený ventilátormi. Linearita ohrevu s rýchlosťou $1^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ v intervale $25^{\circ}\text{C} - 65^{\circ}\text{C}$ bola riadená z počítača cez program LabView 6.1. Detailný popis návrhu a technickej realizácie aparatury je k dohľadaniu v Pavlů (2007, bakalárska práca).



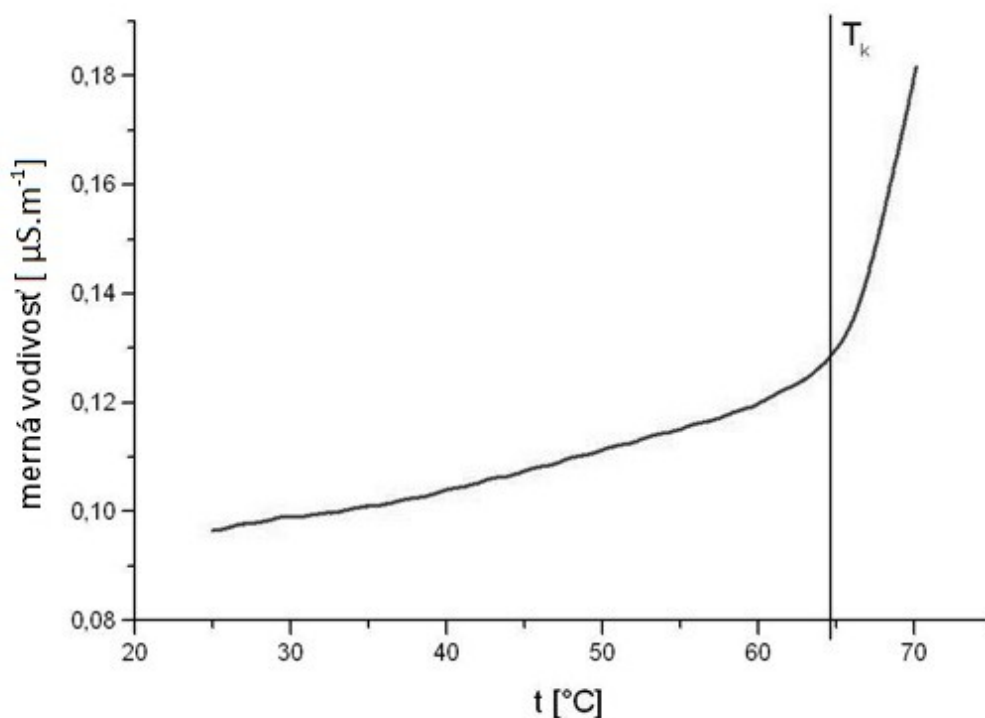
Obr. 8. Detail aparatury – na magnetickej miešačke vidno držiak s kadičkou, naľavo optickú sondu fluorometru PAM 2000, v hornej časti hlavu s ohrievacím telieskom, Peltierovým článkom, ventilátormi a vodivostnou celou konduktometru Gryf 158.

4.3 Meranie mernej vodivosti média

V prípade konduktometrie ide o jednoduchú elektrochemickú metódu, pri ktorej sa pomocou vodivostnej cely stanovuje merná vodivosť roztoku (obr. 9). Odpor elektrolytov (vodičov druhej triedy) meriame mostíkovou metódou. Spravidla používame striedavé napätie, aby nedochádzalo k polarizácii elektród. Pri bežných meraniach sa používajú frekvencie v rádoch 10^1 - 10^3 Hz a napätie zdroja býva v ráde voltov. Pri meraní sa elektrolytom naplní vodivostná cela, čo je nádobka so zatavenými platinovými elektródami. Elektródy sú pokryté platinovou čerňou, aby sa neuplatňovala polarizácia elektród. Pre elektródy s plochou S a vo vzájomnej vzdialenosti l je konduktivita G vyjadrená vzťahom

$$G = \kappa \frac{l}{S},$$

kde κ [$\text{S}\cdot\text{m}^{-1}$] je merná elektrická vodivosť.



Obr. 9. Príklad teplotnej krivky mernej vodivosti (CTC) so znázornenou kritickou teplotou T_k . T_k je stanovená ako bod maximálnej krivosti krivky

Merná vodivosť média, v ktorom bola vzorka umiestnená, bola stanovovaná pomocou prístroja Gryf 158. Vzorka bola umiestňovaná vždy do rovnakého objemu média, 17,5ml deionizovanej vody. Merná vodivosť média bola stanovená pomocou vodivostnej cely, ktorá má plochu elektród a ich vzájomnú vzdialenosť stanovenú výrobcom. Meranie mernej vodivosti média v rozsahu do $20 \mu\text{S}\cdot\text{m}^{-1}$ je realizované 2-vodičovou metódou, čo zaručuje vysokú presnosť merania. Pri meraní je na kontaktoch pre napäťový výstup elektrické napätie úmerné meranej veličine – konkrétne pri meraní mernej vodivosti média v rozsahu 0 – 2000mV (údaje prevzané z oficiálneho návodu k prístroju).

4.4 Meranie fluorescenčnej teplotnej krivky FTC

Fluorescencia bola budená analytickým svetlom s vlnovou dĺžkou 655nm a s intenzitami 10, 5, 1 resp. 0,1 $\mu\text{mol fotónov}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Fluorescencia zo vzorku bola detekovaná pre vlnové dĺžky nad 700nm. Prvé merania ukázali, že na zamedzenie vplyvu fluorescenčného indukčného javu (FIJ) a ustálenie FIJ do rovnovážneho „steady-state“ stavu, je potrebné pred meranie fluorescenčnej teplotnej krivky zaradiť 15 minútový interval s udržiavanou konštantnou teplotou. Zaradením tohto intervalu pred meranie sa výrazne zabránilo poklesu fluorescencie v prvých minútach po začiatku merania. Fluorescenčný indukčný jav prechádza do „steady-state“ stavu po čase v ráde jednotiek minút.

4.5 Spracovanie dát

Namerané dáta boli z programu LabView 6.1 prístupné ako dátový súbor. Na spracovanie bol použitý program Microsoft Excel.

Kritická teplota $T_{c(M1)}$ pre nárast FTC do prvého maxima M_1 bola vyhodnocovaná ako priesečník konštantnej intenzity fluorescence pred nárastom do maxima M_1 a extrapolácie lineárneho nárastu do maxima M_1 . Kritická teplota $T_{c(M2)}$ pre nárast FTC do druhého maxima M_2 bola vyhodnocovaná ako lokálne minimum medzi maximami M_1 a M_2 . Kritická teplota T_k pre maximálny zlom CTC (závislosť mernej vodivosti média κ na teplote t) bola definovaná ako bod maximálnej krivosti CTC krivky. Krivosť krivky k sa vypočíta ako maximum z funkcie krivosti

$$k = \left| \frac{\kappa(t)''}{[1 + (\kappa(t)')^2]^{3/2}} \right|,$$

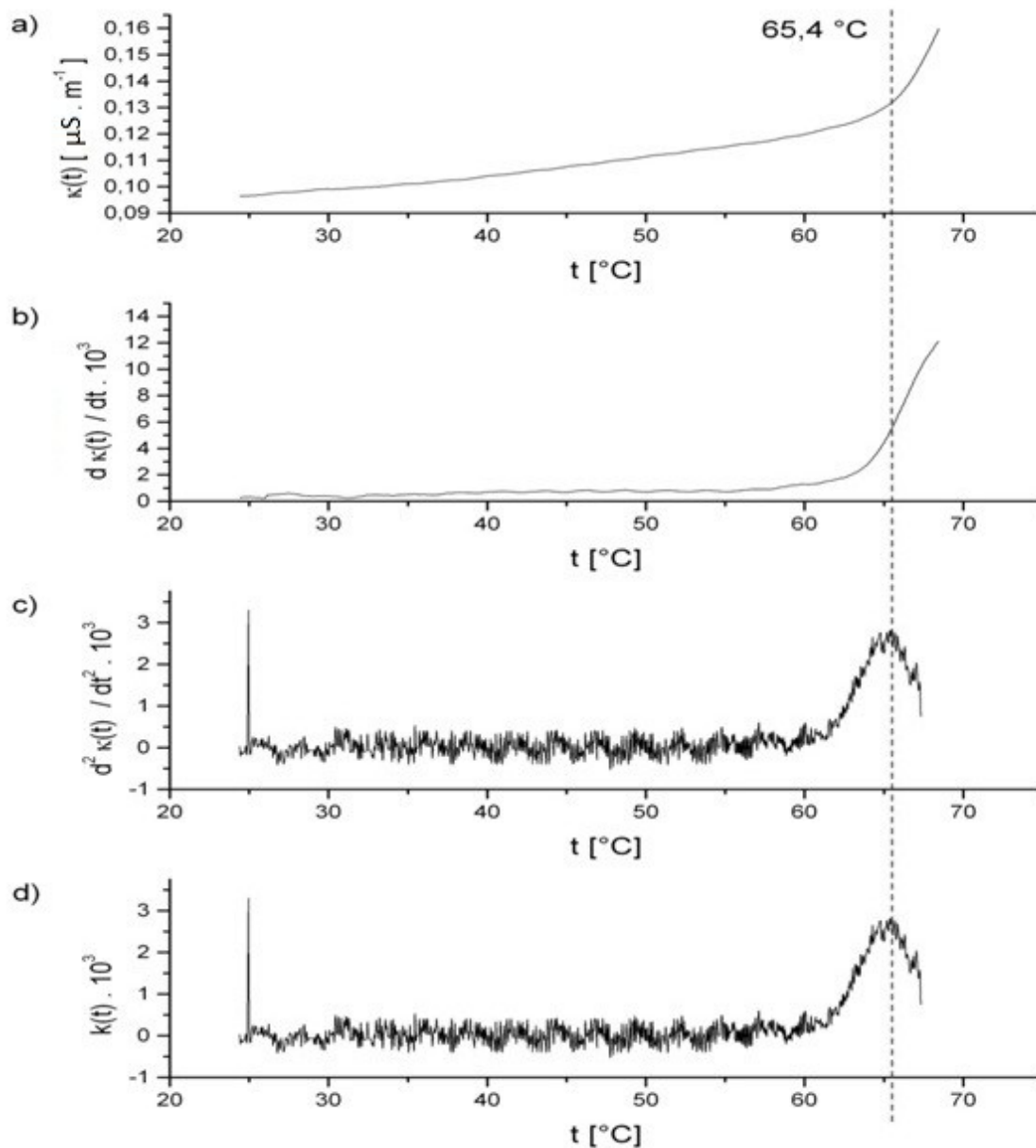
kde $\kappa(t)'$ a $\kappa(t)''$ predstavuje prvú (obr. 10b) a druhú (obr. 10c) deriváciu mernej vodivosti $\kappa(t)$ podľa teploty t . Poloha maxima na grafe priebehu krivosti (obr. 10d) určuje kritickú teplotu T_k .

Pre každú rýchlosť ohrevu bol spočítaný aritmetický priemer a smerodajná odchýlka podľa vzorca

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\bar{\kappa} - \kappa_i)^2}{n-1}},$$

kde $\bar{\kappa}$ je aritmetický priemer a n počet meraní.

Merania boli realizované v 3 opakovaniach a všetky výsledky boli vyhodnotené ako aritmetický priemer a smerodajná odchýlka pre každý zo sledovaných parametrov. Výsledky neboli vyhodnotené pomocou párového T-testu kvôli nevhodnotsti tohto testu pre sady s malým počtom opakovaní. Vo všetkých grafoch FTC a CTC sú zobrazené reprezentatívne krivky, ktoré sú súčasťou sád kriviek, z ktorých boli vyhodnotené výsledky prezentované v tabuľke č. 1.



Obr. 10.

a) Závislosť mernej vodivosti média na teplote – $\kappa(t)$

b) Prvá derivácia mernej vodivosti média podľa teploty – $d\kappa(t)/dt$

c) Druhá derivácia mernej vodivosti média podľa teploty – $d^2\kappa(t)/dt^2$

d) Krivosť krivky $\kappa(t)$

Poznámka: Pre názornosť je k obrázkom pridaná vertikála, zobrazujúca teplotu T_k v mieste maximálnej krivosti krivky

5. Výsledky

Teplotné závislosti mernej vodivosti média a intenzity fluorescence na teplote počas lineárneho ohrevu boli stanovené pre vzorky jačmeňa jarného. Boli uskutočnené merania pre štyri rôzne spracované sady vzorkov – kontrolné vzorky, vzorky infiltrované DCMU, vzorky predhriate na 35°C a pre vzorky zároveň infiltrované DCMU a predhriate na 35°C. Pre každú sadu vzorkov bola zmeraná závislosť na intenzite použitého meracieho svetla z prístroja PAM 2000. Zvolené boli intenzity 10, 5, 1 resp. 0,1 $\mu\text{mol fotónov}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

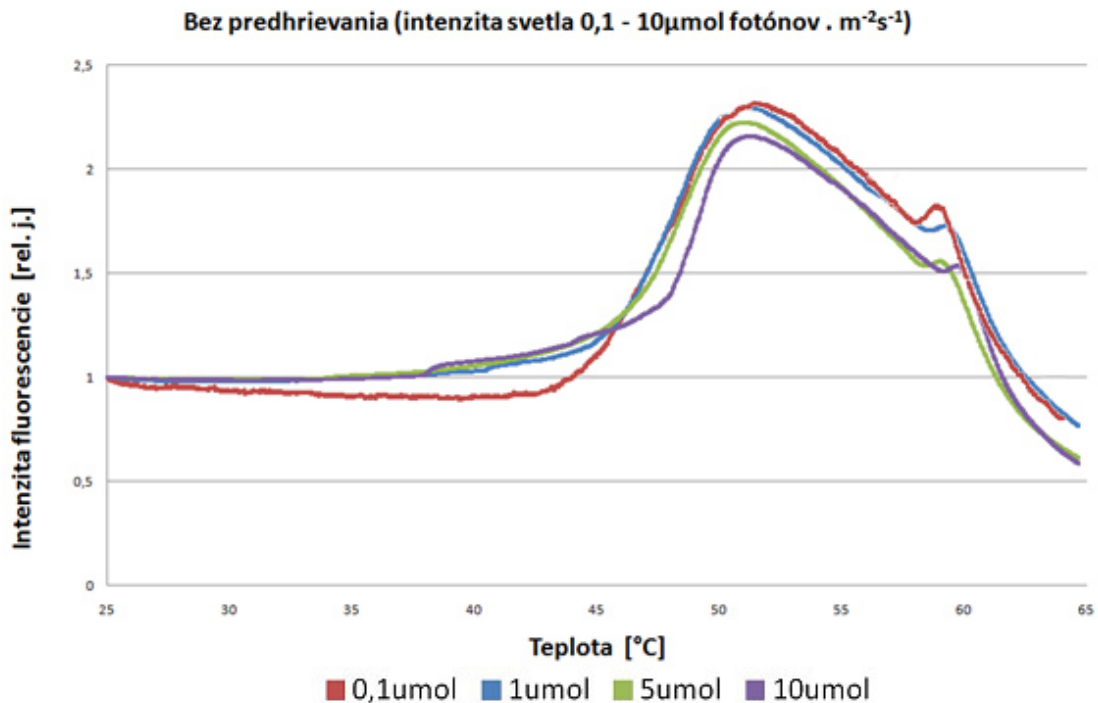
FTC a CTC krivky prezentované v tejto kapitole sú vybrané reprezentatívne krivky. Všetky experimenty boli pre potreby štatistického vyhodnotenia namerané v troch opakovaníach. Výsledné hodnoty aritmetický priemerov a smerodajných odchýliek pre jednotlivé kritické teploty $T_{c(M1)}$, $T_{c(M2)}$ a T_k sú prehľadne zoradené v Tab. 1. Prezentované grafy FTC a CTC kriviek boli normované na hodnotu pri 25°C.

Celkový rozsah kritických teplôt termostability thylakoidnej membrány $T_{c(M1)}$ je 9,2°C, rozsah kritických teplôt termostability pigment-proteínových komplexov v thylakoidnej membráne $T_{c(M2)}$ je 2,0°C, rozsah kritických teplôt termostability plazmalemy T_k je 2,4°C.

5.1 Výsledky stanovenia termostability thylakoidnej membrány

Pre kontrolnú sadu vzorkov (neinfiltrovaných DCMU a inkubovaných pri teplote 25°C boli namerané FTC krivky s charakteristickým priebehom. Pri zvyšovaní teploty okolitého média je zaznamenaný nárast intenzity fluorescence do prvého maxima M_1 . S ďalším zvyšovaním teploty dochádzalo k poklesu intenzity

fluorescencie. Tento pokles je nasledovaný opätovným nárastom do maxima M_2 , po ktorom s ďalším zvyšovaním teploty dochádza k definitívnemu poklesu (obr. 11).

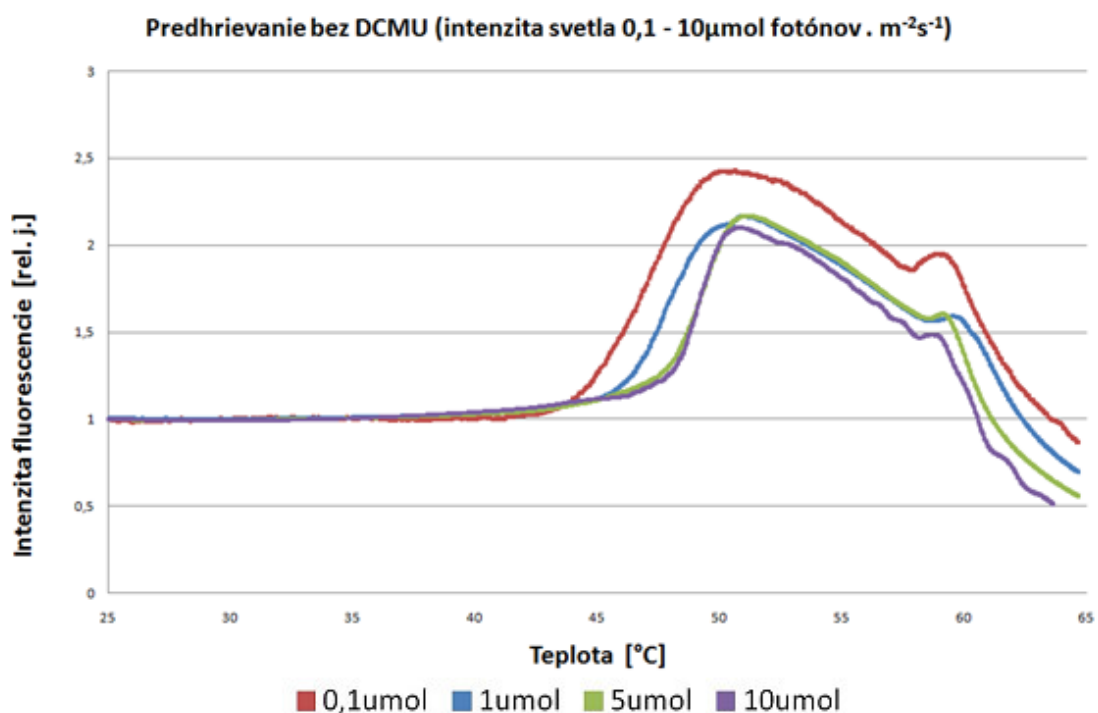


Obr. 11. Graf FTC pre vzorky neinfiltrované DCMU a inkubované pri teplote 25°C po dobu 90 minút. Intenzity použitého svetla 10, 5, 1 a 0,1 μmol fotónov . $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Krivky FTC boli normované na hodnotu intenzity fluorescence pri 25°C.

Pri priamom porovnaní kriviek v závislosti na intenzite analytického svetla je zrejmé, že kritická teplota termostability pigment-proteínových komplexov v thylakoidnej membráne $T_{c(M2)}$ je pre všetky použité intenzity približne rovnaká. So zmenou intenzity dochádza ale k zmene teploty $T_{c(M1)}$ nárastu FTC do maxima M_1 a strmosti nárastu z plata do M_1 . Pri použití najslabšej intenzity 0,1 μmol fotónov. $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ je nárast najpomalší. So zvyšovaním intenzity na hodnoty 1, 5 resp. 10 μmol fotónov. $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ je nárast rýchlejší a jeho začiatok sa posúva smerom k vyšším teplotám. Najpatrnejší je tento posun pre intenzitu meracieho svetla 10 μmol fotónov. $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Rovnako so zvyšovaním intenzity meracieho svetla dochádza k malému posunu

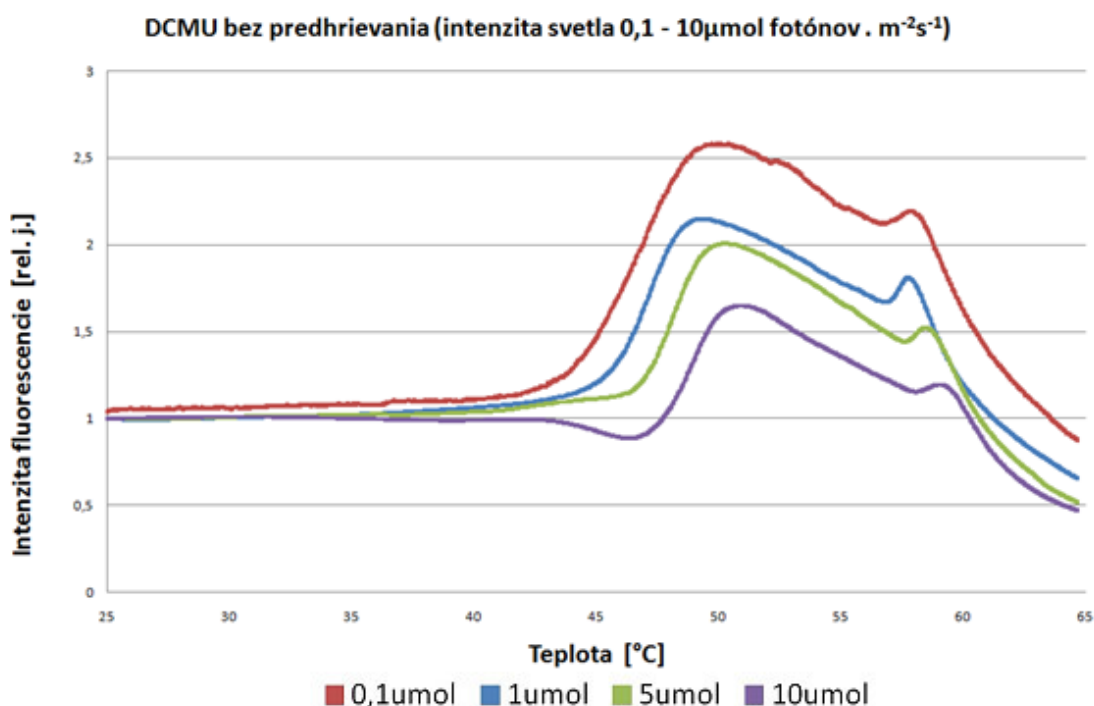
teploty maxima M_1 smerom do vyšších teplôt a k poklesu hodnoty intenzity fluorescence v maxime M_1 , aj keď rozdiel medzi jednotlivými krivkami nie je tak výrazný.

Pre sadu vzorkov predhriatych pred meraním na 35°C po dobu 90 minút boli zmerané FTC krivky zobrazené na obr. 12. Krivky majú podobný priebeh ako krivky zmerané pre kontrolné vzorky. So zvyšujúcou sa intenzitou meracieho svetla dochádza pre všetky krivky k posunu nárastu teploty $T_{c(M1)}$ smerom do vyšších teplôt – z teploty $44,1^\circ\text{C}$ pre intenzitu meracieho svetla $0,1 \mu\text{mol fotónov. m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ až na $48,1^\circ\text{C}$ pre intenzitu meracieho svetla $10 \mu\text{mol fotónov. m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Nárast FTC z plata do maxima M_1 je strmší so zvyšujúcou sa intenzitou. Kritická teplota termostability pigment-proteínových komplexov v thylakoidnej membráne $T_{c(M2)}$ nevykazuje závislosť na použitej intenzite meracieho svetla a zostáva rovnaká.



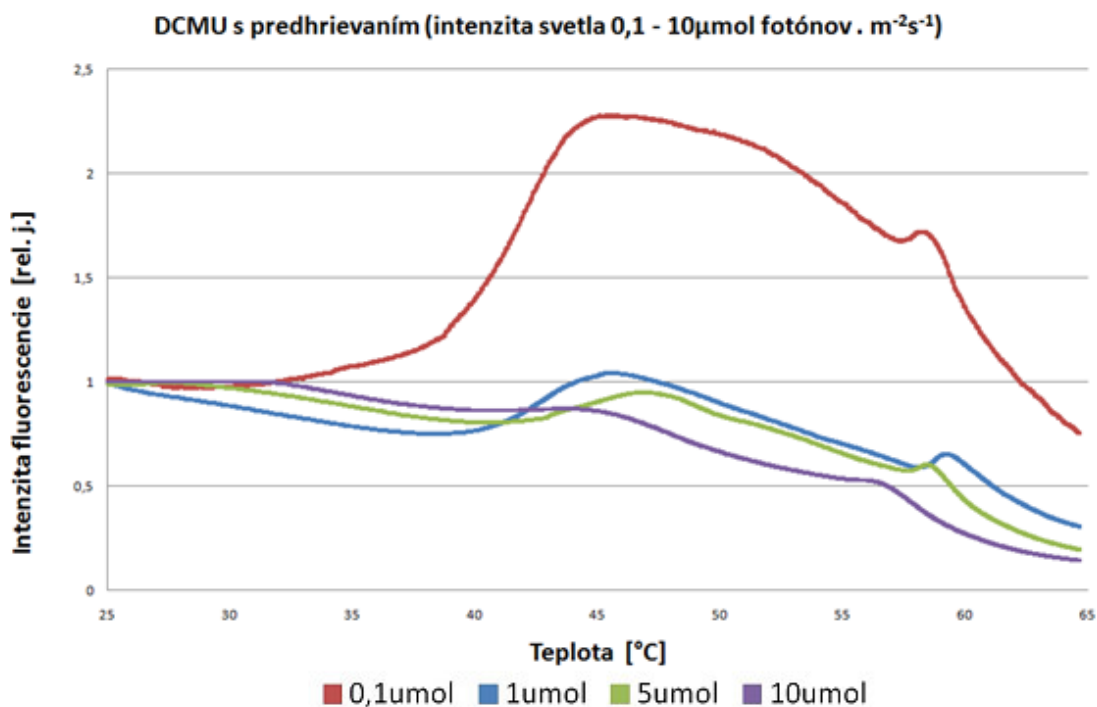
Obr. 12. Graf FTC pre vzorky neinfiltrované DCMU inkubované pri teplote 35°C po dobu 90 minút. Intenzity použitého svetla 10, 5, 1 a $0,1 \mu\text{mol fotónov. m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Krivky FTC boli normované na hodnotu intenzity fluorescence pri 25°C .

Pre sadu vzorkov infiltrovaných DCMU po dobu 90 minút a inkubovaných pri teplote 25°C sú v porovnaní s kontrolou vidieť výrazné zmeny v FTC krivkách (obr. 13). Krivky sú posunuté smerom do nižších teplôt v porovnaní s kontrolou. So zvyšovaním intenzity použitého meracieho svetla dochádza k výraznému poklesu hodnoty maxima M_1 a posunu teploty $T_{(cM1)}$ smerom do vyšších teplôt – z teploty 44,0°C pre intenzitu meracieho svetla 0,1 $\mu\text{mol fotónov. m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ až na 47,5°C pre intenzitu meracieho svetla 10 $\mu\text{mol fotónov. m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Pre intenzitu použitého meracieho svetla 10 $\mu\text{mol fotónov. m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ sa pred nárastom do maxima M_1 objavuje výrazný pokles intenzity fluorescencie. Kritická teplota termostability pigment-proteínových komplexov v thylakoidnej membráne $T_{(cM2)}$ vykazuje len mierny nárast so zvyšujúcou sa intenzitou meracieho svetla – nárast o 1,4°C z 56,8°C na 58,2°C.



Obr. 13. Graf FTC pre vzorky infiltrované 20 μM roztokom DCMU inkubované pri teplote 25°C. Intenzity použitého svetla 10, 5, 1 a 0,1 $\mu\text{mol fotónov. m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Krivky FTC boli normované na hodnotu intenzity fluorescencie pri 25°C.

Pre sadu vzorkov infiltrovaných DCMU a predhriatych na 35°C má charakteristický priebeh len krivka pre intenzitu 0,1 $\mu\text{mol fotónov}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Pri použití intenzity analytického svetla s vyššou intenzitou (1, 5 resp. 10 $\mu\text{mol fotónov}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) dosahuje intenzita fluorescencie svoje maximum už pri teplote 25°C a FTC krivky tak zobrazujú teplotnú závislosť fluorescenčného maxima F_M pre uzavreté reakčné centrá PSII. FTC krivka pre intenzitu meracieho svetla 0,1 $\mu\text{mol fotónov}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ je v porovnaní s ostatnými FTC krivkami meranými pri tejto intenzite výrazne posunutá smerom do nižších teplôt. Tento posuv je detailne znázornený na obr. 14. Dochádza k posunu teploty $T_{c(M1)}$ aj maxima M1 až o 3°C smerom do nižších teplôt. Poloha teploty $T_{c(M2)}$ koreluje s ostatnými krivkami.

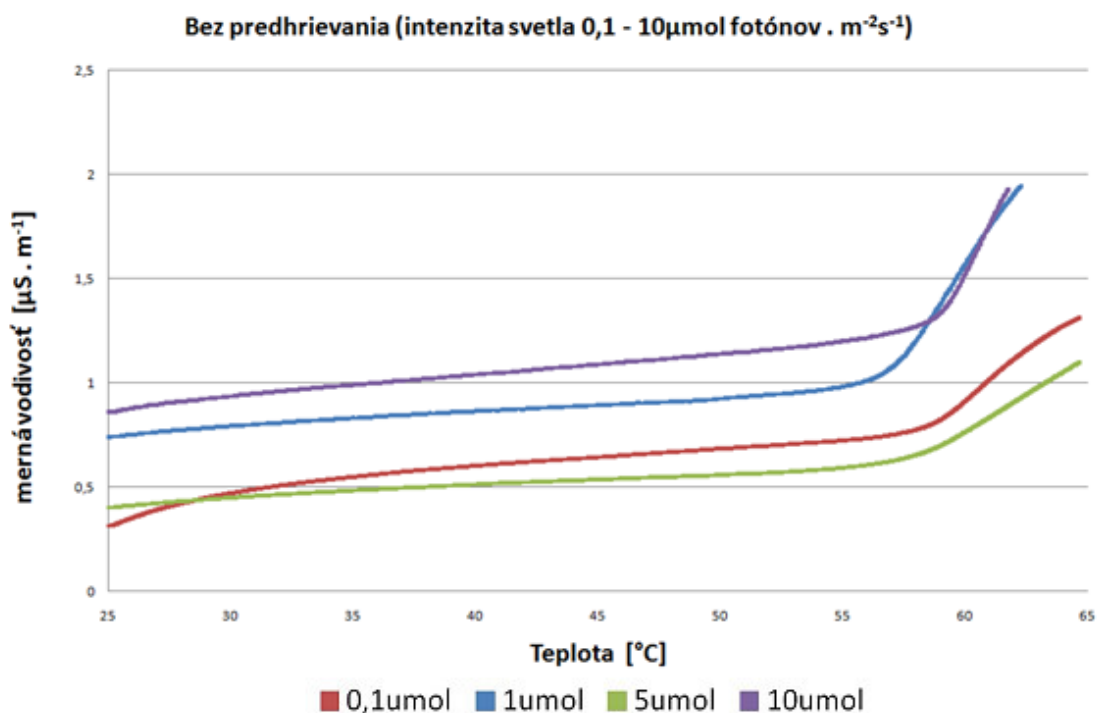


Obr. 14. Graf FTC pre vzorky infiltrované DCMU inkubované pri teplote 35°C po dobu 90 minút. Intenzity použitého svetla 10, 5, 1 a 0,1 $\mu\text{mol fotónov}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Krivky FTC boli normované na hodnotu intenzity fluorescencie pri 25°C.

5.2 Výsledky stanovenia termostability plazmalemy

Kritická teplota termostability plazmalemy T_k je definovaná ako bod maximálnej krivosti krivky mernej vodivosti média v závislosti na teplote (CTC). Graf na obrázku 15 znázorňuje CTC krivky s charakteristickým priebehom, ktoré boli zmerané pre kontrolnú sadu vzorkov (neinfiltrovaných DCMU a inkubovaných pri teplote 25°C po dobu 90 minút) počas lineárneho ohrevu pri rýchlosti 1°C.min⁻¹ v teplotom rozsahu 25°C – 65°C. Pri zvyšovaní teploty okolitého média je zaznamenaný postupný lineárny nárast mernej vodivosti média, ku ktorému dochádza vplyvom vyplavovania iónov z poškodených buniek vzorky do média. Plazmalema pri rastúcej teplote zvyšuje svoju permeabilitu a stráca stabilitu. Po dosiahnutí kritickej tepelnej dávky pri teplotách okolo 58°C praská a ióny sú uvoľnené do merného média. Tým dôjde k rapídному nárastu mernej vodivosti. Ďalším úsekom CTC krivky je rast hodnoty mernej vodivosti média, z dôvodu rýchleho uvoľňovania iónov zo zvyškov buniek do merného média. Tento úsek CTC postupne prechádza do stavu saturácie, ktorá by bola dosiahnutá autoklávovaním. Tým by došlo k úplnej dezintegrácii pletív a uvoľneniu všetkých iónov do merného média. Ďalšie zvyšovanie teploty by na hodnotu mernej vodivosti nemalo vplyv.

Pre sadu kontrolných vzoriek (obr. 15) je vidieť, že použitá intenzita meracieho svetla nemá vplyv na posun kritickej teploty termostability plazmalemy T_k . K dezintegrácii plazmalemy dochádza vo všetkých prípadoch pri kritickej teplote T_k okolo 58°C bez ohľadu na použitú intenzitu meracieho svetla.



Obr. 15. Graf CTC pre vzorky neinfiltrované DCMU inkubované pri teplote 25°C. Intenzity použitého svetla 10, 5, 1 a 0,1 μ mol fotónov . m⁻²s⁻¹.

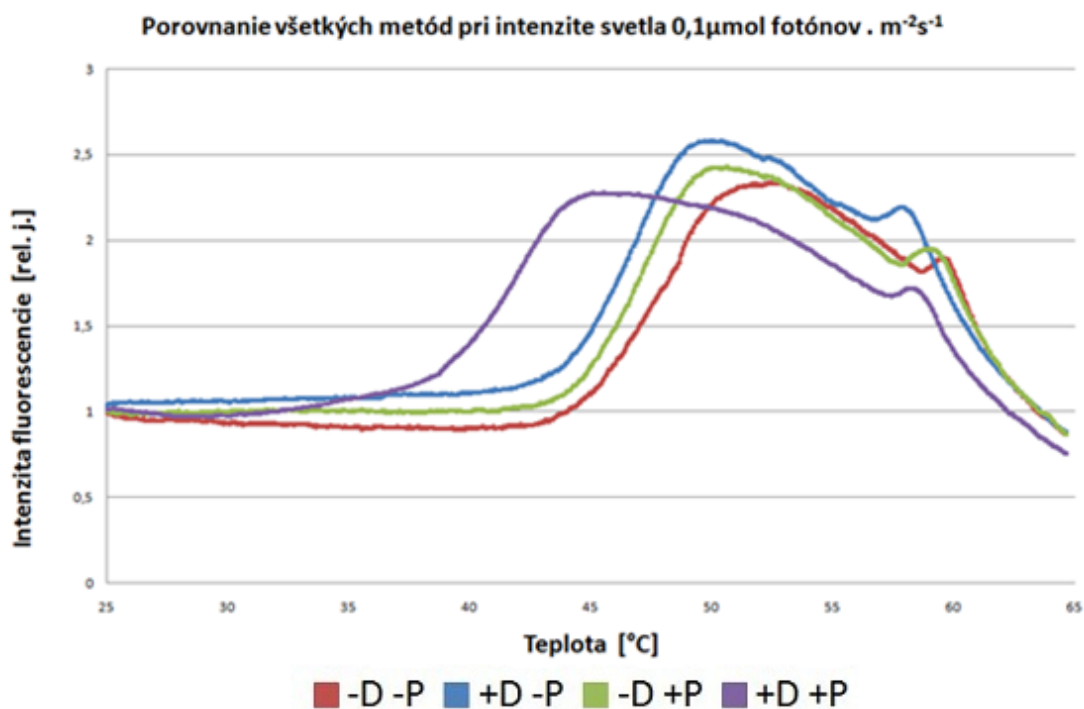
CTC krivky boli zmerané aj pre pre sadu vzorkov predhriatych pred meraním na 35°C po dobu 90 minút. Krivky - v práci nie sú publikované - majú podobný priebeh ako krivky zmerané pre kontrolné vzorky. Kritická teplota termostability plazmalemy T_k nevykazuje výrazný rozdiel v porovnaní s kontrolnou sadou.

Z CTC kriviek (nepublikovaných pre vzájomnú podobnosť) pre sadu vzoriek infiltrovaných 20 μ M roztokom DCMU a inkubovaných pri teplote 25°C, ako aj pre sadu vzorkov infiltrovaných 20 μ M roztokom DCMU a inkubovaných pri teplote 35°C je patrné, že infiltrácia vzoriek DCMU nemá vplyv na kritickú teplotu termostability plazmalemy T_k . DCMU pôsobí na transfer elektrónov medzi chinónovými prenášačmi Q_A a Q_B v thylakoidnej membráne. Súčasné stanovenie FTC a CTC má však výhodu pre určenie termostability v prípade, že kritickú teplotu termostability thylakoidnej membrány nie je možné z FTC určiť, napr. pri použití DCMU (obr. 14).

5.3 Porovnanie výsledkov pre rôzne metódy prípravy vzoriek v závislosti na intenzite meracieho svetla

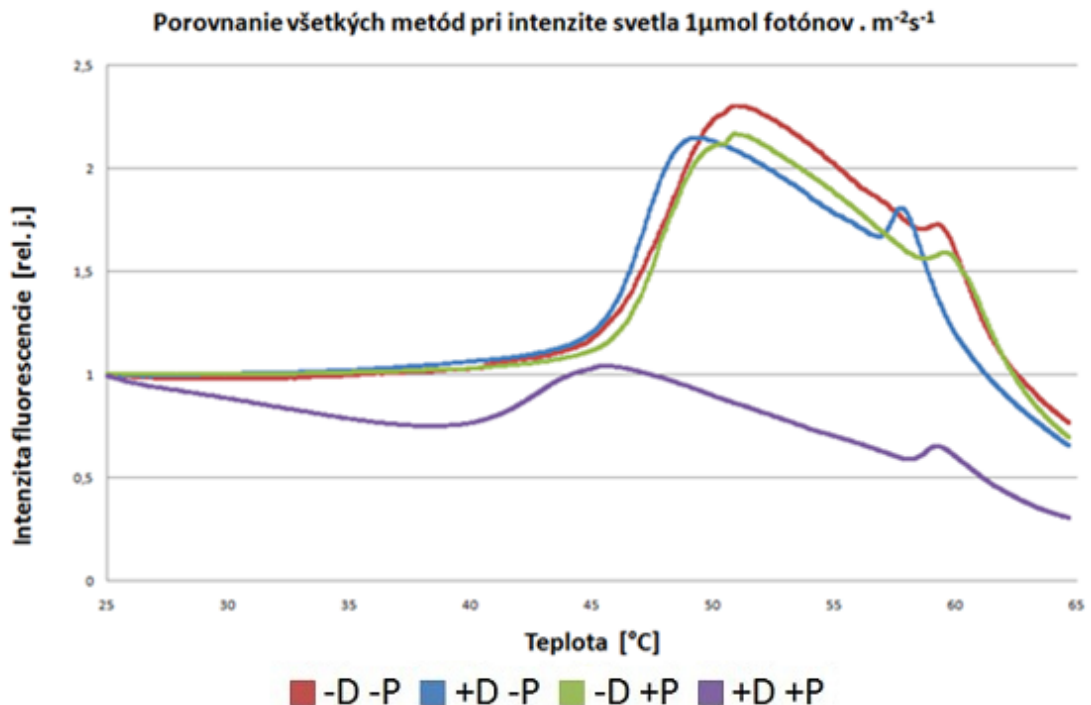
Na nasledujúcich grafoch sú znázornené priebehy FTC kriviek (obr. 16 – 19) pre rôzne metódy prípravy vzoriek merané porovnané vždy pre danú intenzitu použitého meracieho svetla. Priebehy CTC kriviek v tejto kapitole nie sú znázornené, pretože rozdielna intenzita použitého meracieho svetla priamo neovplyvňuje priebeh CTC kriviek.

Pri použití meracieho svetla s intenzitou $0,1\mu\text{mol fotónov}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ boli zaznamenané FTC krivky s charakteristickým priebehom. FTC krivka pre vzorky infiltrované DCMU a inkubované pri 35°C je posunutá smerom od nižších teplôt v porovnaní s ostatnými. Pre vzorky neinfiltrované DCMU a inkubované pri teplote 35°C je zaznamenaný posun kritickej teploty $T_{c(M1)}$ smerom do vyšších teplôt v porovnaní so vzorkami neinfiltrovanými DCMU a inkubovanými pri 25°C .



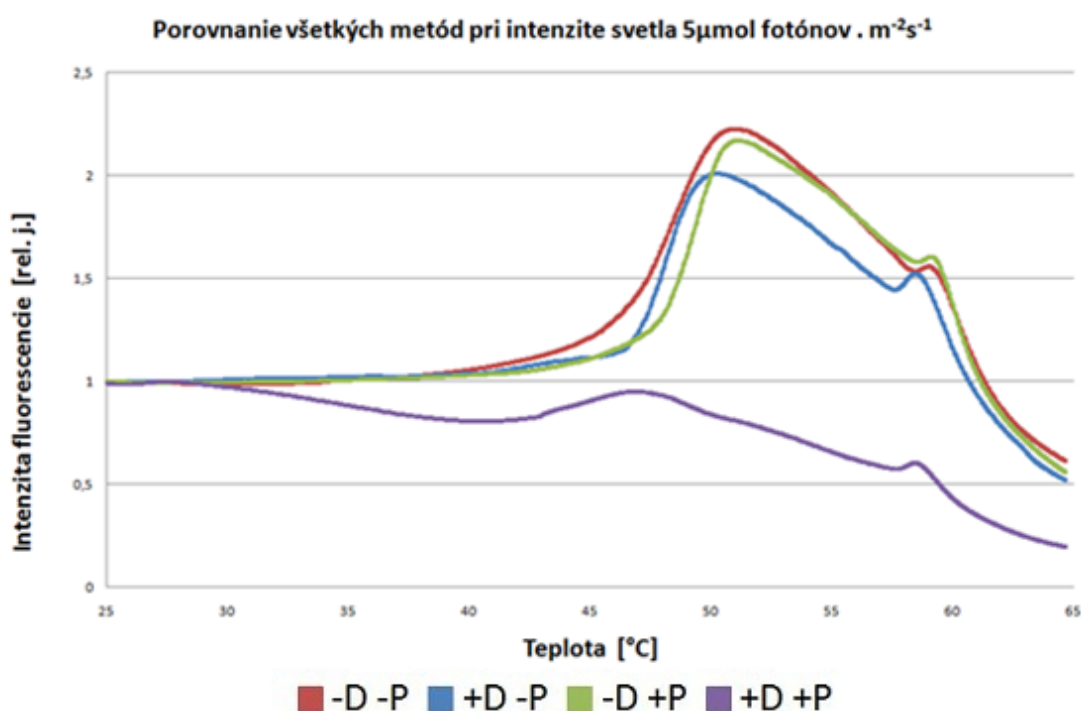
Obr. 16. Súhrnný graf FTC pre vzorky pripravené všetkými 4 metódami. Intenzita použitého svetla $0,1 \mu\text{mol fotónov} \cdot \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Krivky FTC boli normované na hodnotu intenzity fluorescence pri 25°C .

Pri použití meracieho svetla s intenzitou $1 \mu\text{mol fotónov} \cdot \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ boli zaznamenané krivky prezentované na obr. 17. FTC krivka pre vzorky infiltrované DCMU a inkubované pri 35°C sa od ostatných výrazne odlišuje. Maximálna hodnota intenzity fluorescence je dosiahnutá už pri teplote 25°C . So zvyšovaním teploty dochádza k poklesu intenzity fluorescence. Nárast do maxima M_1 je výrazne posunutý smerom do nižších teplôt v porovnaní s ostatnými krivkami. Pre vzorky neinfiltrované DCMU a inkubované pri teplote 35°C je zaznamenaný posun kritickej teploty $T_{c(M1)}$ smerom do vyšších teplôt o približne $0,6^\circ\text{C}$ v porovnaní so vzorkami neinfiltrovanými DCMU a inkubovanými pri 25°C . FTC krivka pre vzorky infiltrované DCMU a inkubované pri 25°C vykazuje najstrmší nárast do maxima M_1 .



Obr. 17. Súhrnný graf FTC pre vzorky pripravené všetkými 4 metódami. Intenzita použitého svetla $1 \mu\text{mol fotónov} \cdot \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Krivky FTC boli normované na hodnotu intenzity fluorescence pri 25°C .

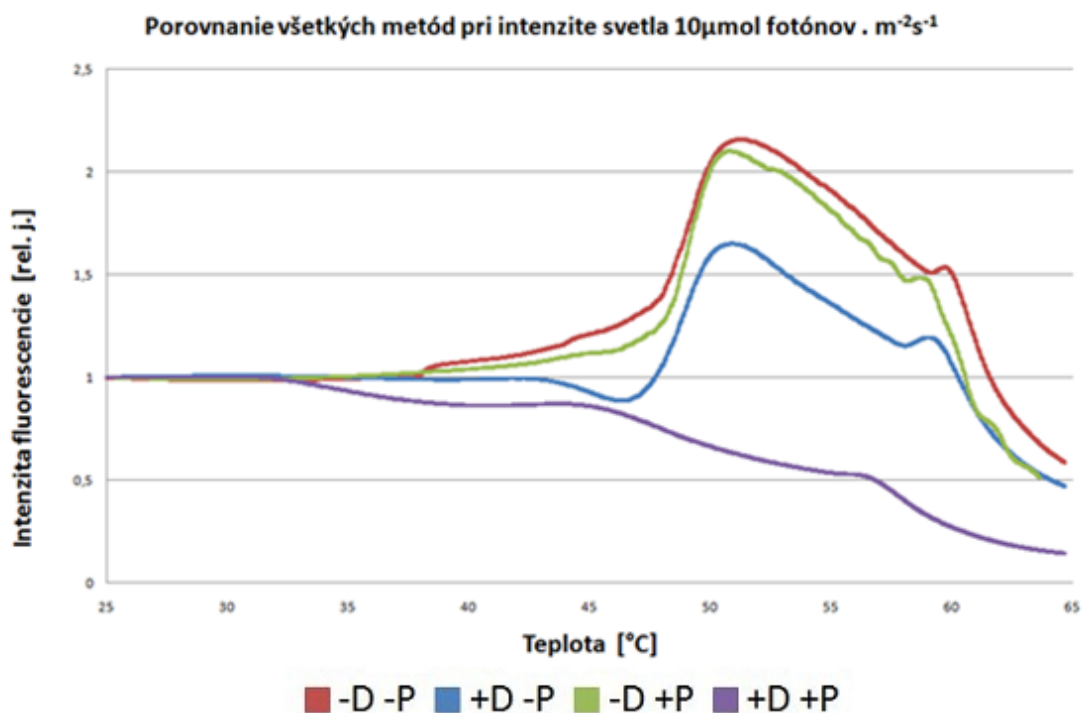
FTC krivky zaznamenané pri použití meracieho svetla s intenzitou $5\mu\text{mol fotónov} \cdot \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ prezentované na obr. 18 vykazujú podobné vlastnosti ako krivky na predchádzajúcom obrázku. FTC krivka pre vzorky infiltrované DCMU a inkubované pri 35°C dosahuje maxima už pri teplote 25°C . Kritická teplota $T_{c(M)}$ pre vzorky neinfiltrované DCMU a inkubované pri teplote 35°C vykazuje posun smerom do vyšších teplôt o približne $1,7^\circ\text{C}$ v porovnaní so vzorkami neinfiltrovanými DCMU a inkubovanými pri 25°C .



Obr. 18. Súhrnný graf FTC pre vzorky pripravené všetkými 4 metódami. Intenzita použitého svetla $5\mu\text{mol fotónov} \cdot \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Krivky FTC boli normované na hodnotu intenzity fluorescence pri 25°C .

Pri použití meracieho svetla s intenzitou $10\mu\text{mol fotónov} \cdot \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ boli zaznamenané krivky prezentované na obr. 19. FTC krivka pre vzorky infiltrované

DCMU a inkubované pri 25°C vykazuje výrazne pokles intenzity fluorescence pred nárastom do maxima M_1 . FTC krivka pre vzorky infiltrované DCMU a inkubované pri 35°C dosahuje maxima už pri teplote 25°C a maximá M_1 a M_2 už nie je jasne stanoviteľné. V porovnaní s obr. 17 a 18 sa stráca posun kritickej teploty $T_{c(M1)}$ pre vzorky neinfiltrované DCMU a inkubované pri teplote 35°C v porovnaní so vzorkami neinfiltrovanými DCMU a inkubovanými pri 25°C.

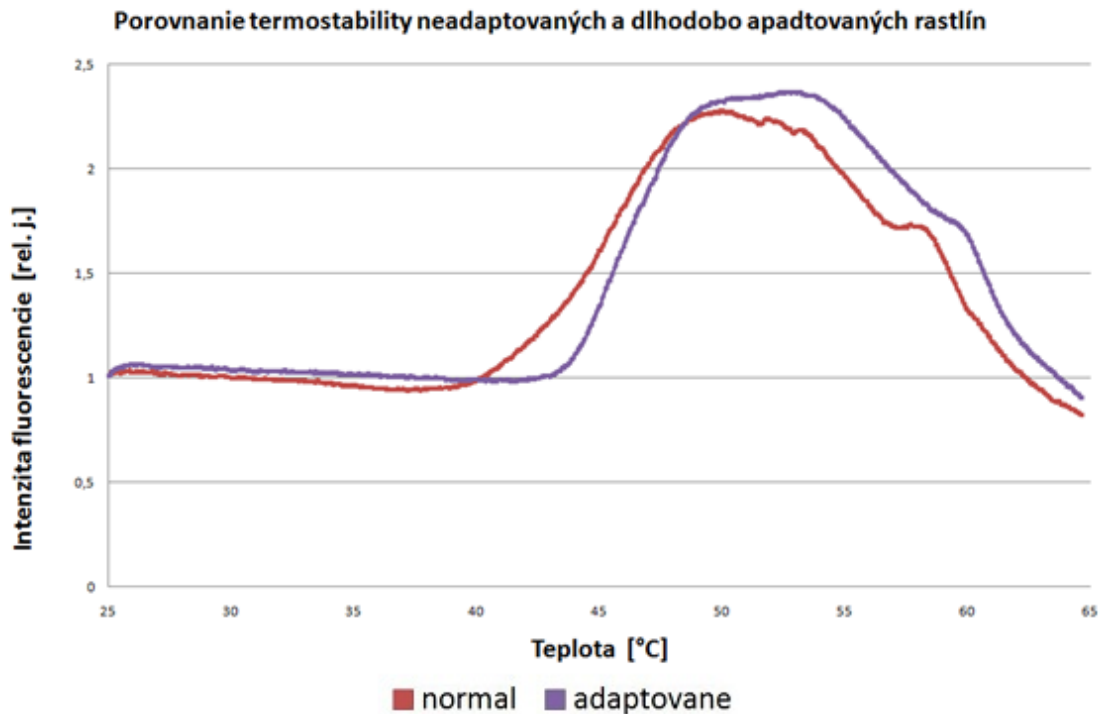


Obr. 19. Súhrnný graf FTC pre vzorky pripravené všetkými 4 metódami. Intenzita použitého svetla $10\mu\text{mol fotónov} \cdot \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Krivky FTC boli normované na hodnotu intenzity fluorescence pri 25°C.

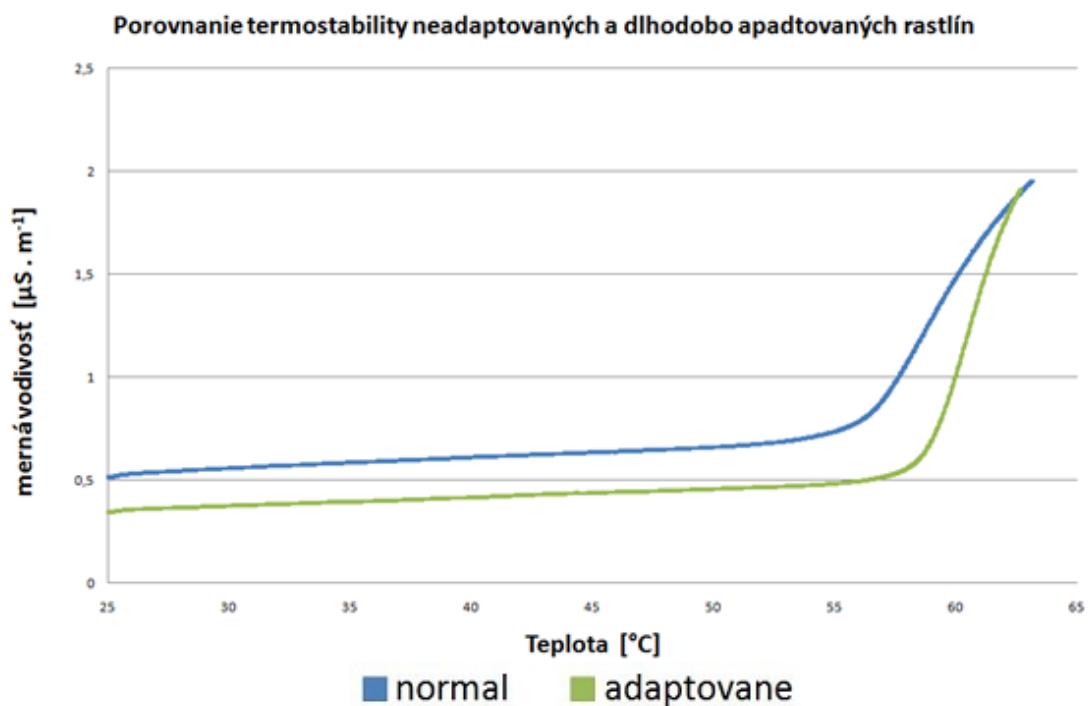
5.4 Porovnanie FTC a CTC kriviek pre dlhodobu adaptované rastliny a kontrolu

Pre test dlhodobej adaptácie rastlín na zvýšenú teplotu bol uskutočnený samostatný experiment. Rastliny jačmeňa jarného boli pestované vo fytokomore pri teplote 25°C po dobu 4 dní. Následne bola časť rastlín presunutá do prostredia so

zvýšenou teplotou 35°C po dobu 3 dni a kontrolné rastliny boli naďalej pestované pri teplote 25°C. FTC a CTC krivky boli zaznamenané rovnakým spôsobom ako pri predchádzajúcich meraniach.



Obr. 20. Graf FTC pre kontrolné vzorky pestované po dobu 7 dní pri teplote 25°C a vzorky pestované posledné 3 dni pred meraním pri zvýšenej teplote 35°C. Krivky FTC boli normované na hodnotu intenzity fluorescencie pri 25°C.



Obr. 21. Graf CTC pre kontrolné vzorky pestované po dobu 7 dní pri teplote 25°C a vzorky pestované posledné 3 dni pred meraním pri zvýšenej teplote 35°C. Predhrievanie spôsobuje adaptáciu rastliny a zvýšenú termostabilitu plazmalemy.

Výsledky experimentu sú prezentované na obrázkoch 20 a 21. FTC krivka pre dlhodobo adaptované rastliny vykazuje posun smerom do vyšších teplôt a strmší nárast do maxima M_1 v porovnaní s kontrolou. Kritická teplota termostability pigment-proteínových komplexov thylakoidnej membrány $T_{c(M2)}$ je detailnejšie zaznamenaná pre kontrolné vzorky. CTC krivky pre obe merania majú charakteristický priebeh. Kritická teplota termostability plazmalemy T_k pre dlhodobo adaptované vzorky je posunutá smerom do vyšších teplôt v porovnaní s kontrolnými vzorkami.

5.5 Prehľadová tabuľka výsledkov

V prehľadovej tabuľke výsledkov sú uvedené vyhodnotenia pre jednotlivé kritické teploty termostability plazmalemy T_k , teploty nárastu FTC do prvého maxima $T_{c(M1)}$ a teploty nárastu FTC do druhého maxima $T_{c(M2)}$. Výsledky sú stanovené ako priemer a smerodajná odchýlka a sú vyhodnotené z troch meraní.

0,1 $\mu\text{mol fotónov. m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$			
	$T_{c(M1)}$ [°C]	$T_{c(M2)}$ [°C]	T_k [°C]
-D -P	(44,8 \pm 0,3)	(58,4 \pm 0,2)	(58,6 \pm 0,5)
+D -P	(44,0 \pm 0,3)	(56,8 \pm 0,4)	(57,7 \pm 0,6)
-D +P	(44,3 \pm 0,4)	(57,9 \pm 0,5)	(58,3 \pm 0,9)
+D +P	(38,9 \pm 0,3)	(57,1 \pm 0,3)	(57,2 \pm 0,4)

1 $\mu\text{mol fotónov. m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$			
	$T_{c(M1)}$ [°C]	$T_{c(M2)}$ [°C]	T_k [°C]
-D -P	(45,4 \pm 0,4)	(58,2 \pm 0,7)	(57,3 \pm 0,5)
+D -P	(45,3 \pm 0,3)	(56,6 \pm 0,3)	(57,4 \pm 0,6)
-D +P	(46,0 \pm 0,5)	(58,6 \pm 0,8)	(58,8 \pm 0,7)
+D +P	n.d.	(58,1 \pm 0,9)	(58,1 \pm 0,4)

5 $\mu\text{mol fotónov. m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$			
	$T_{c(M1)}$ [°C]	$T_{c(M2)}$ [°C]	T_k [°C]
-D -P	(45,7 \pm 0,6)	(58,1 \pm 0,5)	(58,0 \pm 0,4)
+D -P	(46,1 \pm 0,2)	(57,4 \pm 0,3)	(57,7 \pm 0,7)
-D +P	(47,4 \pm 0,5)	(58,5 \pm 0,4)	(58,2 \pm 0,8)
+D +P	n.d.	(57,7 \pm 0,5)	(57,9 \pm 0,4)

10 $\mu\text{mol fotónov. m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$			
	$T_{c(M1)}$ [°C]	$T_{c(M2)}$ [°C]	T_k [°C]
-D -P	(47,2 \pm 0,6)	(58,6 \pm 0,4)	(58,3 \pm 0,4)
+D -P	(47,5 \pm 0,4)	(57,8 \pm 0,5)	(58,4 \pm 0,6)
-D +P	(48,1 \pm 0,4)	(58,2 \pm 0,7)	(58,4 \pm 0,3)
+D +P	n.d.	n.d.	(56,4 \pm 0,7)

Tab. 1. Prehľadová tabuľka výsledkov pre rôzne intenzity použitého meracieho svetla a rôzne metódy prípravy vzoriek.

V tabuľke sú uvedené teploty:

- $T_{c(M1)}$ – teplota nárastu FTC do M_1
- $T_{c(M2)}$ – teplota nárastu FTC do M_2 = kritická teplota termostability pigment-proteínových komplexov thylakoidnej membrány
- T_k – bod maximálnej krivosti CTC = kritická teplota termostability plazmalemy

Výsledky sú zoradené podľa intenzity použitého meracieho svetla: 10, 5, 1 a 0,1 $\mu\text{mol fotónov. m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ a podľa metódy prípravy vzoriek:

- D -P – kontrolné vzorky neinfiltrované DCMU a inkubované pri 25°C
- + D -P – vzorky infiltrované v 20 μM roztoku DCMU po dobu 90 minút
- D +P – vzorky neinfiltrované v DCMU a inkubované pri 35°C
- +D +P – vzorky infiltrované v 20 μM roztoku DCMU po dobu 90 minút a inkubované pri 35°C

n.d. – nedetekovateľné - hodnotu nie je možné z danej krivky stanoviť

Priemer a smerodajná odchýlka sú vyhodnocené z troch meraní.

6. Diskusia

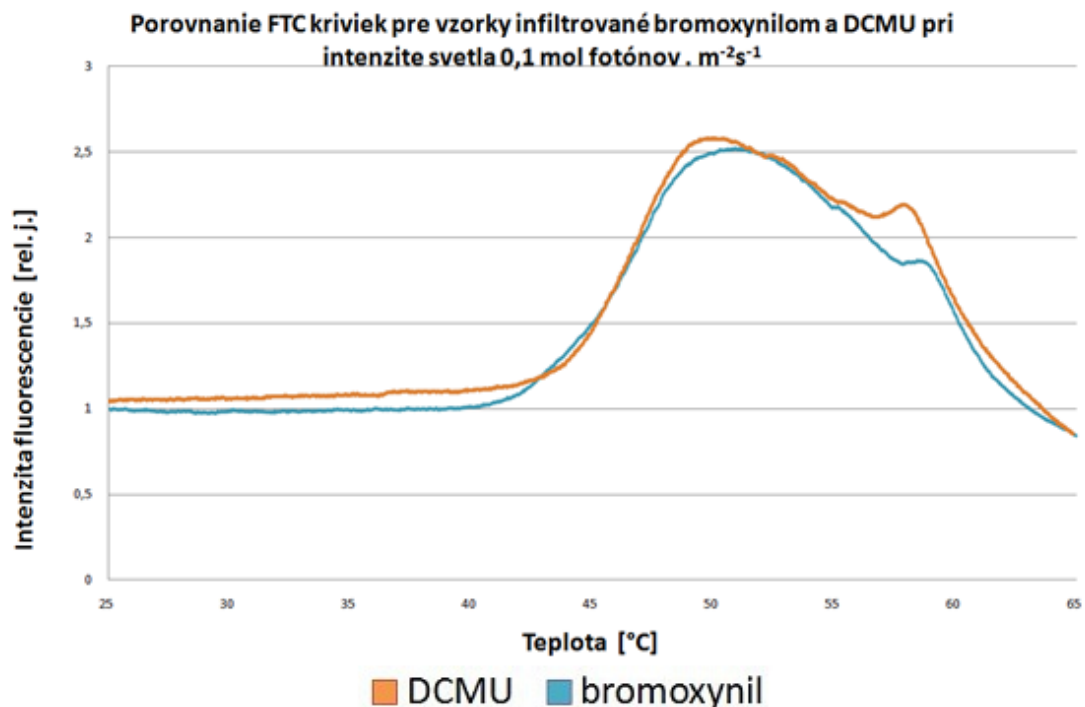
Fluorescenčná teplotná krivka sa bežne používa ako metóda pre stanovenie kritickej teploty termostability thylakoidnej membrány. FTC (obr. 1) so svojimi charakteristickými bodmi M_1 , M_2 , $T_{c(M1)}$ a $T_{c(M2)}$ a ich biologickým významom je dobre preskúmaná. Venuje sa jej viacero autorov – Bilger a kol. (1984), Kuropatwa a kol. (1992), Nauš a kol. (1992), Nauš a Ilík (1997), Kouřil a kol. (2001), Ilík (2002) a ďalší. Pri charakteristickom priebehu fluorescenčnej teplotnej krivky dochádza od teploty 25°C k postupnému nárastu intenzity fluorescence na plate. Pri teplotách okolo 45°C dochádza k výraznému nárastu do maxima M_1 . Tento nárast predstavuje postupné utlmenie procesov brániacich hromadeniu redukovaného Q_A pod vplyvom zvyšujúcej sa teploty. Maximum M_1 tak predstavuje stav s plne redukovanými molekulami prenášača Q_A . Pokles intenzity fluorescence za maximom M_1 je pravdepodobne teplotnou závislosťou fluorescence molekúl chl *a*. Opätovný nárast intenzity fluorescence do maxima M_2 je daný tepelnou denaturáciou PPC a stratou stability thylakoidnej membrány (Ilík, 2002).

Termostabilitu thylakoidnej membrány ovplyvňujú aj zložky, u ktorých sa termostabilizačná funkcia nepredpokladala. Najlepším príkladom je xantofyl zeaxantin. Pôsobením intenzívneho svetla a tepla dochádza k uvoľneniu molekuly violaxantinu z thylakoidnej membrány a k jej dvojitej deepoxidácii cez antheraxantin na zeaxantin. Veľkosť molekuly zeaxantinu zodpovedá približne hrúbke thylakoidnej membrány (cca 30 Å). Dochádza k ukotveniu zeaxantinu v polárnych častiach fosfolipidov na vonkajších stranách membrány a pozdĺžna osa molekuly zeaxantinu je kolmá na povrch membrány. Svojím ukotvením zeaxantin znižuje fluiditu thylakoidnej membrány a zvyšuje jej termostabilitu. Pre sadu kontrolných vzoriek bez použitia DCMU a inkubovaných pri 25°C (obr. 11) dochádzalo so zvyšovaním intenzity meracieho svetla z 0,1 na 10 $\mu\text{mol fotónov}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ k posunu teploty $T_{c(M1)}$ z 44,8°C na 47,2°C. Možnú interpretáciu tohto posunu môžeme hľadať v xantofyle zeaxantine. Je

známe, že pôsobením intenzívneho svetla a tepla dochádza k uvoľneniu molekuly violaxantínu z thylakoidnej membrány a k jej dvojitej deepoxidácii cez antheraxantín na zeaxantín. Veľkosť molekuly zeaxantínu zodpovedá približne hrúbke thylakoidnej membrány (cca 30 Å). Dochádza k ukotveniu zeaxantínu v polárnych častiach fosfolipidov na vonkajších stranách membrány a pozdĺžna osa molekuly zeaxantínu je kolmá na povrch membrány. Svojím ukotvením môže zeaxantín znižovať fluiditu thylakoidnej membrány a zvyšovať tak jej termostabilitu. Zvýšená ožiarenosť vzorky má za následok premenu violaxantínu na zeaxantín a jeho ukotvením do thylakoidnej membrány môže dochádzať k zvýšeniu jej termostability. Táto hypotéza bola bola preskúmaná pomocou FTC na vzorkách listov zemiakov. Vzorky boli pred meraním infiltrované roztokom obsahujúcim 100mM askorbátu s pH 5,5. To spôsobilo masívnu premenu violaxantínu na zeaxantín už pred začiatkom merania. Pri porovnaní FTC kriviek s kontrolnými vzorkami došlo k posunu teploty $T_{c(M1)}$ z 37°C na 40,5°C. FTC krivky boli merané pri rýchlosti lineárneho ohrevu 1°C.min⁻¹. Tieto výsledky priamo podporujú teóriu, že zeaxantín zohráva významnú úlohu pri regulácii termostability thylakoidnej membrány (Havaux a Gruszecki 1993).

Pre nárast intenzity fluorescence do maxima M_1 je dôležitý redoxný potenciál Q_A . Tento potenciál je možné umelo meniť použitím inhibítorov elektrónového transportu medzi chinónovými prenášačmi Q_A a Q_B . Naviazanie inhibítora ovplyvňuje redoxný potenciál primárneho chinónového prenášača Q_A a tým aj redoxný potenciál radikálového páru $P_{680}^{++}Q_A^{\bullet-}$. Infiltrácia DCMU má za následok zvýšenie redoxného potenciálu radikálového páru Q_A/Q_A^- o približne 50 až 55 mV. (napr. Liskay a Rutherford 1998). Dochádza tak k zvýšeniu energetického rozdielu medzi radikálovými párami $P_{680}^{++}Q_A^{\bullet-}$ a $P_{680}^{++}Ph^-$ a tým k zníženiu pravdepodobnosti spätného transferu cez radikálový pár $P_{680}^{++}Ph^-$ - uprednostňuje sa priama nábojová separácia $P_{680}^{++}Q_A^{\bullet-}$. Nedochoádza k vzniku tripletných stavov chlorofylu ani voľných kyslíkových radikálov, a tak infiltrácia DCMU chráni pred fotopoškodením proteínu D1. (Liskay a Rutherford, 1998).

Oproti tomu fenolové inhibítory (napr. bromoxynil) znižujú redoxný potenciál radikálového páru Q_A/Q_A^- o približne 45 mV. To znižuje rozdiel medzi radikálovými párami $P_{680}^{++}Q_A^-$ a $P_{680}^{++}Ph^-$ a uprednostňuje tak spätnú rekombináciu. Tá má za následok tvorbu radikálového páru $P_{680}^{++}Ph^-$ a následne vznik tripletných stavov $^3P_{680}$ a voľných kyslíkových radikálov. Zvyšuje sa tak miera poškodenia pri ožiarení vzoriek. Pôsobenie oboch inhibítorov na redoxný potenciál radikálových párov je znázornené na obr. 22.



Obr. 22. Porovnanie FTC kriviek pre vzorky infiltrované bromoxynilom a DCMU pri intenzite svetla $0, \mu\text{mol fotónov} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Krivky FTC boli normované na hodnotu intenzity fluorescencie pri 25°C .

Pri použití DCMU a bromoxynilu nebol zistený výrazný rozdiel v tvare FTC kriviek (obr. 22). Tieto výsledky svedčia o tom, že zmena redoxného potenciálu použitím inhibítorov nemá vplyv na nárast fluorescencie do maxima M_1 pri nízkych intenzitách meracieho svetla. Nepriamo to dokazuje výskum vzniku kyslíkového radikálu 1O_2 pri infiltrácii vzoriek DCMU a bromoxynilom v závislosti na intenzite

použitého meracieho svetla (Fufezan a kol. 2005). V tejto práci nebol zistený rozdiel v tvorbe $^1\text{O}_2$ pri nízkych intenzitách použitého meracieho svetla až do $200 \mu\text{mol fotónov.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. K výraznej zmene došlo až pri použití vysokých intenzít ($1000 \mu\text{mol fotónov.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ a viac) a množstvo vzniknutého $^1\text{O}_2$ bolo približne 2-krát vyššie pre vzorky infiltrované bromoxynilom ako pre vzorky infiltrované DCMU. Tieto výsledky nepriamo dokazujú, že pre intenzity do $200 \mu\text{mol fotónov.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ nemá použitie inhibítorov a tým aj zmena redoxného potenciálu Q_A vplyv na FTC krivky.

Meranie závislosti mernej vodivosti média na teplote počas lineárneho ohrevu je novou metódou pre rýchle stanovenie termostability plazmalemy. Z nameraných kriviek mernej vodivosti možno jednoduchým matematickým aparátom pomocou výpočtu maxima krivosti krivky stanoviť kritickú teplotu termostability plazmalemy T_k . CTC krivka má charakteristický tvar. Od začiatku merania je zaznamenaná lineárna závislosť mernej vodivosti κ na teplote t . Plazmalema pri rastúcej teplote zvyšuje svoju permeabilitu a stráca stabilitu. Po dosiahnutí kritickej tepelnej dávky praská a ióny sú uvoľnené do merného média. Tým dôjde k rapídному nárastu mernej vodivosti. Ďalším úsekom CTC krivky je rast hodnoty mernej vodivosti média, z dôvodu postupného uvoľňovania iónov zo zvyškov bunky do merného média. Inou príčinou rastu hodnoty mernej vodivosti môže byť tepelná závislosť už vyplavených iónov. Tento úsek CTC postupne prechádza do stavu saturácie, ktorá by bola dosiahnutá autoklávaním. Tým by došlo k úplnej dezintegrácii pletív a uvoľneniu všetkých iónov do merného média. Ďalšie zvyšovanie teploty by na hodnotu mernej vodivosti κ nemalo vplyv. Bod s najväčšou krivosťou krivky definujeme ako kritickú teplotu termostability plazmalemy T_k . CTC krivky pri každom meraní začínajú na hodnote mernej vodivosti okolo $0,1 \mu\text{S.m}^{-1}$. To jednak naznačuje na rovnaký objem použitej vzorky, pre vzájomnú porovnateľnosť meraní. Zároveň to dokazuje, že hodnota mernej vodivosti s iónmi vyplavenými z buniek je približne 10x väčšia ako merná vodivosť deionizovanej vody. Z toho vyplýva, že deionizovaná voda je vhodná ako merné médium pre použitie v konduktometrických meraniach.

Klasickej konduktometrickej metóde ako metóde pre stanovenie kritických podmienok stability plazmalemy sa venuje viacero autorov - Ruter (1993), Srinivasan a kol. (1996), Dai a kol. (1997), Bajji a kol. (2001), Nesbitt a kol. (2002), Gulen a Eris (2003), Zhu a kol. (2004). Ich metodika dáva síce presné výsledky, ale je pomalá. Čas potrebný pre zmeranie jednej vzorky sa pohybuje okolo 5 hodín. Meranie závislosti mernej vodivosti média na teplote počas lineárneho ohrevu je nová metóda s oveľa menšou časovou náročnosťou. Pre zmeranie jednej vzorky vrátane potrebnej prípravy stačí 30 – 110 minút v závislosti na zvolenej rýchlosti lineárneho ohrevu.

Pri zvyšovaní intenzity použitého meracieho svetla nedochádzalo k zmene termostability plazmalemy. Plazmalema neobsahuje pigment-proteínové komplexy, a preto zmena intenzity meracieho svetla nemá na termostabilitu plazmalemy vplyv. V porovnaní s výsledkami iných autorov bol predpoklad, že inkubácia vzoriek pred meraním pri zvýšenej teplote 35°C po dobu 90 minút bude mať za následok zvýšenie termostability plazmalemy. Bolo ukázané, že inkubácia rastlín hrachu pri 35°C po dobu 24 hodín má za následok nižší výtok iónov pri meraní CTC kriviek a celkovo vyššiu termostabilitu plazmalemy (Srinivasan a kol. 1996). Namierané CTC krivky nepreukázali vplyv predhrievania na zvýšenie termostability plazmalemy. Doba predhrievania 90 minút pravdepodobne nie je dostatočná na adaptáciu rastliny na zvýšenú teplotu. Toto tvrdenie podporuje aj experiment dlhodobej adaptácie rastlín na zvýšenú teplotu pri pestovaní. Rastliny jačmeňa jarného boli pestované vo fytokomore pri teplote 25°C po dobu 4 dní. Následne bola časť rastlín presunutá do prostredia so zvýšenou teplotou 35°C po dobu 3 dni a kontrolné rastliny boli naďalej pestované pri teplote 25°C. Ako vidno na obrázkoch 20 a 21, rastliny adaptované na vyššiu teplotu počas pestovania vykazovali vyššiu termostabilitu plazmalemy aj thylakoidnej membrány v porovnaní s kontrolnými rastlinami.

Adaptácia rastlín na zvýšenú teplotu po dobu 3 dní mala za následok výrazné zvýšenie termostability. Pri FTC krivkách došlo k posunu kritických teplôt $T_{c(M1)}$ z 41,1°C na 43,5°C a $T_{c(M2)}$ z 56,3°C na 59,0°C v prospech adaptovaných rastlín. Zvýšenú odolnosť vykazovala aj plazmalema adaptovaných rastlín – kritická teplota termostability plazmalemy T_k pre adaptované rastliny bola 58,2°C v porovnaní s T_k 55,9°C pre kontrolné rastliny. Tieto výsledky sú v súlade s výsledkami predchádzajúcich prác v danej oblasti, v ktorých bola použitá adaptácia na zvýšenú teplotu po dobu 24 hodín (Srinivasan a kol. 1999).

Predhrievanie rastlín po dlhšiu dobu pred meraním vedie k ich adaptácii a následne pri meraní k zvýšeniu termostability thylakoidnej membrány aj plazmalemy. Keďže vo výsledkoch sa nepreukázalo podstatné zvýšenie termostability pod vplyvom predhrievania, predhrievanie po dobu 90 minút nie je pre adaptáciu rastlín na zvýšené teploty dostatočné. Môžeme z toho dedukovať, že pre zvýšenie termostability sú potrebné procesy, ktorých trvanie je dlhšie.

7. Záver

V tejto diplomovej práci bol vypracovaný prehľad problematiky termostability thylakoidných membrán a plazmalemy. Bola popísaná metodika a použitie fluorescenčnej teplotnej krivky pre stanovenie termostability thylakoidnej membrány a metodika teplotnej krivky mernej vodivosti média pre stanovenie termostability plazmalemy.

V práci bol ukázaný vplyv DCMU a efektu predhrievania vzorkov na 35°C na termostabilitu thylakoidnej membrány a plazmalemy. DCMU, blokujúce prenos elektrónov medzi prenášačmi Q_A a Q_B , ovplyvňuje priebeh FTC krivky. Má za následok utlmenie procesov brániacich hromadeniu redukovaného Q_A a pri použití vyšších intenzít meracieho svetla tak dochádza k nárastu fluorescencie do maximálnej hodnoty F_M už pri teplote 25°C. Použitie predhrievania vzorkov pred meraním má podľa rešerše problematiky viesť k adaptácii vzoriek a má mať za následok zvýšenie termostability. Pri predhrievaní vzoriek na teplotu 35°C po dobu 90 minút pred meraním sa tento predpoklad nepotvrdil. Pri porovnaní s výsledkami iných autorov je doba 90 minút nedostatočná pre adaptáciu vzoriek. V samostatnom experimente bol efekt predhrievania otestovaný na rastlinách pestovaných počas prvých 4 dní pri teplote 25°C a následne posledné 3 dni pred meraním pri teplote 35°C. Táto doba adaptácie na zvýšené teploty sa preukázala ako dostatočná. Zvýšenie termostability thylakoidnej membrány aj plazmalemy je jasne dokázané na FTC resp. CTC krivkách na obrázkoch 20 a 21.

Významným faktor ovplyvňujúcim termostabilitu thylakoidnej membrány môže byť xantofylový cyklus, u ktorého sa doteraz táto funkcia nepredpokladala. K premene violaxantínu na zeaxantín dochádza pri zvýšenej ožiarenosti vzoriek. Vzorky vystavené vyšším intenzitám ožiarenia pri meraní vykazovali zvýšenie termostability

thylakoidnej membrány až o 2,4°C. V práci nebola koncentrácia xantofylov stanovovaná, táto teória by ale bola v súlade s publikovanou literatúrou (najmä práce Havaux a kol.)

V ďalšom výskume problematiky bude vhodné sa zamerať na efekt predhrievania a adaptácie rastlín na zvýšené teploty po rôznu dobu, ako aj na úlohu xantofylového cyklu v termostability thylakoidnej membrány. FTC a CTC krivky merané počas lineárneho ohrevu vzoriek predstavujú pre tento výskum rýchle a spoľahlivé metódy.

8. Zoznam použitej literatúry

Armond P, Björkman O, Staehlin A (1980) Dissociation of supramolecular complexes in chloroplast membranes. A manifestation of heat damage to the photosynthetic apparatus. *Biochimica et Biophysica Acta* 601, 433–442

Bajji M, Kinet JM, Lutts S (2001) The use of the electrolyte leakage for assesing cell membrane stability as a water stress tolerance test in durum wheat. *Plant Growth Regulation* 00, 1-10

Bilger HW, Schreiber U, Lange OL (1984) Determination of leaf heat resistance; comparative investigation of chlorophyll fluorescence changes and tissue necrosis methods. *Oecologia* 63, 256-262

Brentel I, Seltsam E, Lindblom G (1985) Phase equilibria of mixtures of plant galactolipids. The formation of bicontinuos cubic phase. *Biochimica et Biophysica Acta* 812, 816-826

Cao J, Govindjee (1990) Chlorophyll-a fluorescence transient as an indicator of active and inactive Photosystem-II in thylakoid membranes. *Biochimica et Biophysica Acta* 1015, 180-188

Dai Q, Yan B, Huang S, Liu X, Peng S, Miranda MLL, Chavez AQ, Vergara BS, Olszyk DM (1997) Response of oxidative stress defense systems in rice (*Oryza sativa*) leaves with supplemental UV-B radiation. *Physiologia Plantarum* 101, 301-308

Ducret JM, Peeva V, Havaux M (2007) Chlorophyll thermofluorescence and thermoluminescence as complementary tools for the study of temperature stress in plants. *Photosynthetic Research* 93, 159-171

Fufezan C, Rutherford AW, Liskay AK (2002) Singlet oxygen production in herbicide-treated photosystem II. *FEBS Letters* 532, 407-410

Fufezan C, Drepper F, Juhnke HD, Lancaster CRD, Un S, Rutherford AW, Liskay AK (2005) Herbicide-induced changes in charge recombination and redox potential of Q_A in the T4 mutant of *Blastochloris viridis*. *Biochemistry* 44, 5931-5939

Gounaris K, Brain APR, Quinn PJ (1983) Structural and functional changes associated with heat-induced phase-separations of non-bilayer lipids in chloroplast thylakoid membranes. *FEBS Letters* 153, 47-52

Gounaris K, Brain APR, Quinn PJ, Williams WP (1984) Structural reorganisation of chloroplast thylakoid membranes in response to heat-stress. *Biochimica et Biophysica Acta* 766, 198-208

Gulen H, Eris A (2003) Some physiological changes in strawberry (*Fragaria x ananassa* 'Camarosa') plants under heat stress. *Journal of Horticultural Science & Biotechnology* 78, 894-898

Havaux M (1998) Carotenoids as membrane stabilizers in chloroplasts. *Trends in plant science* 3, 147-151

Havaux M, Gruszecki WI (1993) Heat- and light-induced chlorophyll a fluorescence changes in potato leaves containing high or low levels of the carotenoid zeaxanthin:

indications of a regulatory effect of zeaxantin on thylakoid membrane fluidity. *Photochemistry and Photobiology* 58, 607-614

Ilík P, Kotabová E, Špundová M, Novák O, Kaňa R, Strzalka K (2010) Low-light-induced violaxanthin de-epoxidation in shortly preheated leaves: uncoupling from Delta pH-dependent nonphotochemical quenching. *Photochemistry and Photobiology* 86, 722-726.

Kóta Z, Szalontai B, Droppa M, Horváth G, Páli T (2002) The formation of an inverted hexagonal phase from thylakoid membranes upon heating. *Cellular and Molecular Biology Letters* 7, 126-128

Kouřil R, Lazár D, Ilík P, Skotnica J, Krchňák P, Nauš J (2004) High-temperature induced chlorophyll fluorescence rise in plants at 40-50°C: experimental and theoretical approach. *Photosynthesis Research* 81, 46-66

Kuropatwa R, Nauš J, Mašláň M (1992) Basic properties of the chlorophyll temperature curve. *Photosynthetica* 27, 129-138

Lazár D, Brokeš M, Nauš J, Dvořák L (1998) Mathematical modelling of 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea action in plant leaves. *Journal of Theoretical Biology* 191, 79-86

Lazár D, Ilík P (1997) High-temperature induced chlorophyll fluorescence changes in barley leaves Comparison of the critical temperatures determined from fluorescence induction and from fluorescence temperature curve. *Plant science* 124, 159-164

Lazár D, Pospíšil P (1999) Mathematical simulation of chlorophyll a fluorescence rise measured with 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea barley leaves at room and high temperatures. *European Biophysical Journal* 28, 468-477

Liszkay AK, Rutherford AW (1998) Influence of herbicide binding on the redox potential of the quinone acceptor in photosystem II: relevance to photodamage and phytotoxicity. *Biochemistry* 37, 17339-17344

Liszkay AK (2004) Singlet oxygen production in photosynthesis. *Journal of experimental botany* 56, 337-346

Nauš J, Ilík P (1997) Fluorescence temperature curve and fluorescence reabsorption of chlorophyll a in leaves. *Biologica* 41, 157-166

Nesbitt ML, Ebel RC, Findley D, Wilkins B, Woods F, Himelrick D (2002) Assays to assess freeze injury of Satsuma Mandarin. *HortScience* 37, 871-877

Nishihara M, Yokota K, Kito M (1980) Lipid molecular species composition of thylakoid membranes. *Biochimica et Biophysica Acta* 617, 12-19

Pajerová K (2006) Konduktometrické měření propustnosti biologických membrán. *Bakalářská práce, UP Olomouc*

Pavlů M (2007) Využití programovatelných prvků k měření a řízení fyzikálního experimentu. *Bakalářská práce, UP Olomouc*

Pearcy WR, Berryb AJ, Forkb CD (1977) Effects of growth temperature on the thermal stability of the photosynthetic apparatus of *Atriplex lentiformis*. *Plant Physiology* 59(5), 873-878

Pospíšil P, Tyystjärvi E (1999) Molecular mechanism of high temperature induced inhibition of acceptor side of Photosystem II. *Photosynthetic Research* 62, 55-66

Quinn PJ (1987) Lipid phase behaviour and lipid-protein interactions in the chloroplast photosynthetic membrane. *Biochemical Society Transactions* 15(1). 86-91

Raison JK, Roberts JKM, Berry JA (1982) Correlations between the thermal stability of chloroplast (thylakoid) membranes and the composition and fluidity of their polar lipids upon acclimation of the higher plant, *Nerium oleander*, to growth. *Biochimica et Biophysica Acta* 688, 218-228

Ruter JM (1993) High-temperature-induced electrolyte leakage from excised leaves and roots of three pollies. *HortScience* 28, 927-928

Rutherford AW, Lizskay AK (2001) Herbicide-induced oxidative stress in photosystem II. *Trends in biochemical sciences* 26, 648-651

Srinivasan A, Takeda H, Senboku T (1996) Heat tolerance in food legumes as evaluated by cell membrane thermostability and chlorophyll fluorescence techniques. *Euphytica* 28, 35-35

Tardy F, Havaux M (1997) Thylakoid membrane fluidity and thermostability during the operation of the xanthophyll cycle in higher-plant chloroplasts. *Biochimica et Biophysica Acta* 1330, 179-193

Williams WP, Brain APR, Dominy PJ (1992) Induction of non-bilayer lipid phase separations in chloroplast thylakoid membranes by compatible co-solutes and its

relation to the thermal stability of Photosystem II. *Biochimica et Biophysica Acta* 1099, 137-144

Williams WP, Brain APR, Quinn PJ, Anderson PW (1990) In *plant lipid biochemistry. Structure and utilization*. Portland Press, 62-64

Young AJ, Phillip D, Ruban AV, Horton P, Frank HA (1997) The xanthophyll cycle and carotenoid-mediated dissipation of excess excitation energy in photosynthesis. *Pure and applied chemistry* 69, 2125-2130

Zhu Z, Wei G, Li J, Qian Q, Yu J (2004) Silicon alleviates salt stress and increases antioxidant enzymes activity in leaves of salt-stressed cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Plant Science* 167, 527-533